

**PCT**

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation 6 :</b> C12N 15/55, C12Q 1/42, C12N 1/21, 15/70, C12Q 1/18 // (C12N 1/21, C12R 1:19)		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> WO 96/17066  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 6. Jun: 1996 (06.06.96)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP95/04711  <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 30. November 1995 (30.11.95)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> P 44 42 970.3 2. Dezember 1994 (02.12.94) DE 195 05 645.0 18. Februar 1995 (18.02.95) DE  <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BYK GULDEN LOMBERG CHEMISCHE FABRIK GMBH [DE/DE]; Byk-Gulden-Strasse 2, D-78467 Konstanz (DE).  2) <b>Erfinder (für alle Bestimmungsstaaten ausser CA US):</b> SCHÄFER, Klaus, P.; Hegaublick 44, D-78465 Konstanz (DE). WEITZENEGGER, Thomas; Friedrichstrasse 4, D-78464 Konstanz (DE). STEINHILBER, Wolfram; Herzog-Erchanger-Strasse 16, D-78333 Stockach (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> MELCHERS, Klaus [DE/DE]; Im Grund 13, D-78267 Aach (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AU, BG, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, HU, JP, KR, LT, LV, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, UA, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
<b>(54) Title:</b> SCREENING MODEL  <b>(54) Bezeichnung:</b> SCREENING-MODELL  <b>(57) Abstract</b>  A screening-model is disclosed for determining the inhibiting effect of substances on the P-type ATP-ase activity of <i>Helicobacter</i> . The screening model in question comprises: (a) a recombinant organism consisting of host cells transformed with at least one P-type ATP-ase gene which can be controlled via a promoter; (b) an inductor for gene activation of the P-type ATP-ase; (c) cations which inhibit the metabolic activity of the recombinant organism only in the presence of <i>Helicobacter</i> P-type ATP-ase; and (d) a measurement device determining the metabolic activity of the recombinant organism.  <b>(57) Zusammenfassung</b>  Es wird ein Screening-Modell zur Bestimmung der die P-Typ ATPase-Aktivität von <i>Helicobacter</i> hemmenden Wirkung von Substanzen beschrieben, das a) einen rekombinanten Organismus bestehend aus mit mindestens einem über einen Promoter steuerbaren P-Typ ATPase-Gen transformierten Wirtszellen, b) einen Induktor zur Genaktivierung der P-Typ ATPase, c) Kationen, welche die Stoffwechselaktivität des rekombinanten Organismus nur in Gegenwart von <i>Helicobacter</i> -P-Typ ATPase beeinträchtigen, und d) eine Meßeinrichtung zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität des rekombinanten Organismus umfaßt.			

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

## Screening-Modell

### Technisches Gebiet

Die Erfindung betrifft ein Screening-Modell zur Bestimmung der die P-ATPase-Aktivität von *Helicobacter* hemmenden Wirkung von Substanzen.

### Stand der Technik

*Helicobacter pylori* (*H. pylori*) ist ein humanpathogenes, gastrisches Bakterium, dessen Eradikation aus dem Magen heute als obligate Voraussetzung für die dauerhafte Heilung von *H. pylori*-assoziierten Krankheiten gilt. Der Keim wird im Magen vorzugsweise in und unter der Schleimhaut, mitunter auch zwischen den Epithelzellen gefunden. Durch die Einzigartigkeit des Milieus, in dem sich der Keim befindet, muß *H. pylori* stoffwechselphysiologische Strategien entwickelt haben, die sein Überleben im Gastrointestinalbereich des Menschen ermöglichen.

Es ist heute bekannt, daß das Auftreten des Keims häufig mit der Entwicklung von Gastritis, Ulcer und mit bestimmten Formen des Magenkrebses ursächlich assoziiert ist. Die heute üblichen Therapieformen basieren auf der Gabe von Substanzen, die die Aktivität der gastrischen Protonen-Pumpe, die  $H^+/K^+-ATPase$ , inhibieren zusammen mit antibiotisch wirkenden Substanzen, die einerseits wirkmechanistisch nicht immer verstanden sind und andererseits die Gefahr der Ausbildung von Resistenzen beinhalten. Aufgrund der weiten Verbreitung des Keims und der bis heute unbefriedigenden Therapie-Strategien ist daher der Bedarf an neuen Therapie-Strategien groß.

Das Primär-Screening nach helicobacteriziden Substanzen basiert heute zum einem weitgehend auf in vitro Methoden wie dem Agardilutionstest, mit dem sich die minimale inhibitorische Konzentration bezüglich des *H. pylori*-Wachstums bestimmen läßt. Daneben werden häufig auch helicobacter-infizierte Tiere als in vivo Modelle für das Screening von helicobacteriziden Substanzen eingesetzt. In beiden Fällen ist der relativ aufwendige Umgang mit dem Keim notwendig, der sich einerseits durch ein relativ langsames Wachstum, weshalb längere Züchtungs- bzw. Kultivierungszeiten benötigt werden, und andererseits durch anspruchsvolle Medienbedingungen auszeichnet (Mikroaerophilie, Serumzusatz ist notwendig). Zudem ist *H. pylori* humanpathogen (nach dem Deutschen Bundesseuchengesetz als S2 klassifiziert) und die Handhabung daher mit entsprechenden Sicherheitsmaßnahmen und Auflagen verbunden. Bei der Entwicklung von helicobacteriziden Arzneimitteln ist daher der Bedarf nach einfachen in vitro Primär-Screening-Modellen, mit deren Hilfe sich auch der Einsatz an Versuchstieren in der primären Screeningphase reduzieren läßt, groß. Solche

Screening-Modelle können Grundlage sein für die Entwicklung von geeigneten, sicheren und effizienten Therapieformen zur Eradikation dieses humanpathogenen Bakteriums. Die Targets zukünftiger Eradikationsstrategien sollten, um eine sichere und möglichst helicobacterspezifische Wirkung zu gewährleisten, nach Möglichkeit in ihrer molekularen Struktur und biochemisch-physiologischen Bedeutung für den Keim beschrieben werden können. Auf der Basis von rekombinanten Screening-Modellen, an denen die Wirkung von Drugs auf klonierte Helicobacter-Funktionen untersucht werden kann, ist die Entwicklung und Verbesserung von Drugs unter Berücksichtigung von Drug-Target-Wechselwirkungen bis in den molekularen Bereich möglich.

#### Beschreibung der Erfindung

Eine Aufgabe der Erfindung ist in der Zurverfügungstellung eines Screening-Modells zu sehen, das ohne besondere Sicherheitsauflagen und ohne den Einsatz von Versuchstieren das Primär-Screening von Substanzen mit Helicobacter hemmender Wirkung erlaubt.

Es wurde nun festgestellt, daß die Messung der Stoffwechselaktivität eines rekombinanten Organismus, der mit mindestens einem über einen Promotor steuerbaren helicobacterspezifischen P-ATPase-Gen transformiert ist, in Gegenwart von Kationen, welche die Stoffwechselaktivität des rekombinanten Organismus nur zusammen mit Helicobacter-P-ATPase hemmen, zur effektiven und hochselektiven Bestimmung der helicobacterhemmenden Wirkung von zu untersuchenden Substanzen verwendet werden kann.

Ein Gegenstand der Erfindung ist daher ein Screening-Modell zur Bestimmung der die P-ATPase-Aktivität von Helicobacter hemmenden Wirkung von Substanzen umfassend

- a) einen rekombinanten Organismus bestehend aus mit mindestens einem über einen Promotor steuerbaren P-ATPase-Gen transformierten Wirtszellen,
- b) einen Induktor zur Genaktivierung der P-ATPase,
- c) Kationen, welche die Stoffwechselaktivität des rekombinanten Organismus nur in Gegenwart von Helicobacter-P-ATPase beeinträchtigen, und
- d) eine Meßeinrichtung zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität des rekombinanten Organismus.

Weitere Gegenstände ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Aus dem H. pylori-Genom wurden DNA-Fragmente isoliert, die für Plasma-Membran assoziierte ATPasen vom P-Typ kodieren, im folgenden P-ATPasen oder Helicobacter-P-ATPasen genannt. Näher untersucht wurden insbesondere die ATPasen 439 und 948. Die Helicobacter-P-ATPase-Gene wurden gereinigt,

kloniert, sequenziert und funktionell in transformierten *E. coli* exprimiert. Die Funktion bzw. Aktivität der heterologen Genprodukte interferiert mit der metabolischen Aktivität des rekombinanten Mikroorganismus, wie z.B. mit der Protonen-Konzentration in der unmittelbaren Umgebung der Zellen, und kann daher meßtechnisch erfaßt werden. Die rekombinanten Organismen, die das spezielle P-ATPase-Gen exprimieren, können benutzt werden, biologische und/oder chemische Verbindungen, die die Aktivität der HP-P-ATPase beeinflussen, vorzugsweise inhibieren, zu detektieren (Screening) und für die Wirkung auf *Helicobacter* zu optimieren.

Das Wirt-Vektorsystem erlaubt das Screening nach Substanzen, die mit der klonierten ATPase interagieren, ohne primär mit dem relativ aufwendig zu kultivierenden *H. pylori* und nach Sicherheitsstufe S2 klassifizierten Keim arbeiten zu müssen.

Daneben kann auf dieser Basis über die Expression von gezielt mutierten ATPase-Sequenzen die molekulare Wechselwirkung zwischen Protein (Target) und Inhibitor gezielt analysiert werden (Aufklärung des Wirk- bzw. Bindungsmechanismus). Somit bietet das System auch die Grundlage für ein gezieltes Design von Inhibitoren (drug development).

Die Isolierung der ATPase-Gene aus dem *H. pylori*-Genom sowie deren Insertion in bakterielle Expressionsvektoren und Klonierung erfolgen nach an sich bekannten Methoden.

Als Wirtszellen wurden vorzugsweise Abkömmlinge von *E. coli* K12 verwendet, wobei *E. coli* MM294 bevorzugt ist.

Als bakterielle Expressionsvektoren kommen die üblichen, kommerziell erhältlichen Plasmide für die bakterielle Expression in Frage. Hierbei ist der hybride Tac-Promotor aus dem lac/trp-System bevorzugt, aber ebenso sind weitere Promotoren wie beispielsweise trc, lac oder trp einsetzbar. Als Expressionsplasmid eignet sich auch insbesondere pTI2-1, welches in Kapitel 3.1.2 im Detail beschrieben ist.

Das erfindungsgemäße Modell zum Screening nach Substanzen, die die P-ATPase-Aktivität von *Helicobacter* hemmen, besteht aus einem rekombinanten Organismus, transformiert mit mindestens einem *Helicobacter*-P-ATPase-Gen, das von einem Promotor aus exprimiert wird. Die Synthese der P-ATPase führt in der Wirtszelle zu einer Sensitivität gegenüber Medien, die neben C- bzw. N-Quellen eine Reihe von Ionen, darunter  $\text{NH}_4^+$ -Ionen, enthalten. Diese P-ATPase-vermittelte Sensitivität der Wirtszelle äußert sich phänotypisch durch eine unmittelbare und signifikante Verminderung bzw. Veränderung der zellulären Stoffwechselaktivität, die meßtechnisch erfaßt werden kann. Dieser Effekt auf die zelluläre Aktivität des rekombinanten

Organismus, der nur unter Expression der Helicobacter-P-ATPase(n) gefunden wird, kann beispielsweise durch ortho-Vanadat, einem Inhibitor von P-ATPasen, verhindert werden. Das Modell eignet sich daher zum Screening und zur Verbesserung von spezifischen Inhibitoren der Helicobacter-P-ATPase(n), die spezifisch mit der Helicobacter-P-ATPase-Aktivität interagieren.

Die Funktion des Modells wird nachstehend am Beispiel eines rekombinanten Organismus gezeigt, der aus einer E. coli K12-Wirtszelle und einem rekombinanten Expressionsplasmid besteht. In das Plasmid wurde eine P-ATPase inseriert, die aus H. pylori (HP) isoliert wurde. Die abgeleitete Aminosäuresequenz des P-ATPase-Gens zeigt in der computergestützten Homologie-Analyse signifikante Ähnlichkeit mit bereits bekannten bakteriellen und eukaryontischen P-ATPasen, insbesondere mit solchen, deren Funktion im Transport von zweiwertigen Kationen liegt. Das Gen bzw. Genprodukt stellt ein mögliches Target für eine differentielle Drug-Therapie von H. pylori-assoziierten Krankheiten dar. Das Gen bzw. dessen rekombinante Expression in anderen Organismen ermöglicht das Screening und die Detektion von Substanzen, die das spezielle Gen und/oder die korrelierende Genfunktion in ihrer Aktivität beeinflussen, vorzugsweise inhibieren.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht das spezifische und selektive Primär-Screening auf Basis einer speziellen Helicobacter-Funktion (P-ATPase-Aktivität) mit Hilfe von rekombinanten Organismen, die als nichthumanpathogen eingestuft und von ihrer Handhabung her deutlich anspruchloser sind. Da P-ATPasen von essentieller Bedeutung für den milieu- bzw. keimspezifischen Ionenhaushalt bakterieller Organismen wie H. pylori sind, stellen diese hochselektive Targets für die differentielle Helicobacter-Therapie dar, über die der Keim in seinem natürlichem Habitus durch entsprechende Verbindungen in seiner vitalen Integrität entscheidend inhibiert und abgetötet werden kann.

Zur Messung der Stoffwechselaktivität des rekombinanten Organismus eignen sich alle als Maß für die Stoffwechselaktivität von bakteriellen Zellen bekannten Parameter. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eignet sich insbesondere die Bestimmung des pH-Wertes in der unmittelbaren Umgebung von aktiven Zellen. Zur Messung sind handelsübliche Cytosensor-Microphysiometer (Firma. Molecular Devices, Grärfelfing) besonders geeignet. Als Maß für die Stoffwechselaktivität wird die Acidifizierungsrate, d. h. die Geschwindigkeit, mit der das Medium durch die zelluläre Stoffwechselaktivität angesäuert wird, verwendet.

### Experimentelles

Die beschriebenen Arbeitsschritte und Methoden betreffen insbesondere die Isolierung, Analyse, Klonierung

und Expression von DNA. Diese Methoden sind in ihrer Art und Technik gut verstanden und beschrieben worden. Die experimentellen Arbeiten wurden nach diesen üblichen Methoden der Gen- bzw. Molekularbiologie durchgeführt (Molecular Cloning, Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Die Computer-gestützte Analyse von gewonnenen DNA-Sequenzen zur Detektion von ORFs (Open reading Frames / offenen Leserahmen), Homologie-Untersuchungen u.a. kann mit den in großer Vielfalt zur Verfügung stehenden genetischen Computerprogrammen und Datenbanken durchgeführt werden (z.B. DNASIS/PROSIS, PC-Gene, UW-GCG).

1. Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem H.pylori-Genom, die P-Typ-ATPase-Gene und benachbarte DNA-Regionen mit weiteren Helicobacter-Genen enthalten.

#### 1.1 Beschreibung der Gensonde

Bei Beginn der Arbeiten waren aus dem HP-Genom keine P-ATPasen isoliert und entsprechende DNA-Sequenz-Information daher nicht verfügbar. Ein Homologie-Vergleich von P-ATPase-Sequenzen aus anderen pro- und eukaryontischen Organismen zeigt, daß diese Enzymklasse neben einer beachtlichen Strukturhomologie auch über Bereiche verfügt, in denen die Aminosäure-(AS)-Primärsequenzen stark konserviert vorliegen. Eine besonders konservierte Region, deren Existenz namensgebend für diese Klasse der Membran-ATPasen ist, stellt die Phosphorylierungsstelle (P-Stelle) der P-ATPasen dar. Von der AS-Primärsequenz der P-Stelle wurde ein DNA-Oligonukleotid abgeleitet (I282), das eine selektionierte Subpopulation von 16 DNA-Sequenzvariationen von mehr als 2000 möglichen darstellt. Das 20bp Oligonukleotid I282 stellt eine Mischung von 16 verschiedenen DNA-Sequenzen dar, die für die DKTGT(I/L)T Konsens-Sequenz von P-ATPasen kodieren. Nachstehend ist die Aminosäuresequenz im Einbuchstaben- und Dreibuchstaben-Code über der DNA-Sequenz des DNA-Oligonukleotids angegeben:

D	K	T	G	T	I/L	(T)
Asp	Lys	Thr	Gly	Thr	Ile	(Thr)
					Leu	

5' - GAT AAA ACC GGC ACC ATC AC - 3'

A                    G T G

Das mit Digoxigenin markierte DNA-Oligonukleotid I-282 wurde zunächst in Southern-Blot-Analysen mit genomischer DNA aus HP und E. coli, die zuvor mit den Restriktionsendonukleasen EcoR1, Hind3 bzw. Ava2 verdaut wurden, eingesetzt. Das DNA-Oligonukleotid hybridisierte effizient mit der HP-DNA und zeigte sich daher als geeignet für ein nachfolgendes Gen-Screening. I-282 hybridisierte auch mit der E. coli-DNA, was für die Screening-Strategie von besonderer Bedeutung war.

Von der AS-Primärsequenz der P-Konsensus-Region wurden weitere DNA-Oligonukleotide abgeleitet, die für die DKTGT(I/L)T-Konsensus-Sequenz von P-ATPasen kodieren (P-Region\P-Stelle). Diese abgeleiteten 20bp langen DNA-Sonden stellen verschiedene Subpopulationen und damit DNA-Sequenzvariationen der P-Region dar. In ihrer Länge entsprechen diese dem DNA-Oligonukleotid I-282. I-405 bis I-409 entsprechen dem gesamten DNA-Sequenz-Pool, der alle möglichen Sequenzen dieser Region umfaßt. Diese Oligonukleotide können entsprechend der Vorgehensweise bei I-282 für die Detektion und Isolierung von potentiellen P Typ-Genen durch Anwendung der üblichen Markierungs- und Hybridisierungsmethoden eingesetzt werden.

Nachstehend sind die DNA-Sequenzen der DNA-Oligonukleotid-Mischungen (DNA-Sonden I-405, I-406, I-407, I-408 und I-409) in 5'-3'-Richtung angegeben:

GA(TC) AA(AG) AC(AGCT) GG(AGCT) AC(AGTC) AT(TC) AC ist I-405,  
GA(TC) AA(AG) AC(AGCT) GG(AGTC) AC(AGTC) AT(CA) AC ist I-406,  
GA(TC) AA(AG) AC(AGCT) GG(AGTC) AC(AGTC) TT(AG) AC ist I-407,  
GA(TC) AA(AG) AC(AGCT) GG(AGTC) AC(AGTC) CT(TC) AC ist I-408

und

GA(TC) AA(AG) AC(AGCT) GG(AGTC) AC(AGTC) CT(AG) AC ist DNA-Oligonukleotid I-409.

Positionen in Klammern mit mehreren Basen stellen variable Positionen dar. Die Moleküle wurden für die Hybridisierungsexperimente mit dem Digoxigenin 3'-Endmarkierungskit (Boehringer Mannheim) entsprechend der Vorschrift des Herstellers markiert. Aus dem direkten Sequenzvergleich dieser DNA-Oligonukleotide (I-405 bis I-409) mit der Basenabfolge und -Komplexität der DNA-Sonde I-282 zeigt sich, daß die Sonden I-405 bis I-409 jeweils deutlich degenerierter, d.h. in ihrer Sequenz variabler, sind. Die höhere Komplexität dieser Sonden sollte es ermöglichen, wenn diese alle zum Einsatz kommen, die gesamte P Typ-ATPase-Familie zu isolieren. Durch die erhöhte Degeneration der Sonden im Vergleich zu I-282 erhöht sich zwar die Gefahr der Isolierung von "falsch positiven" Plasmiden aus der H.pylori-Genbank, die aber auf Ebene der DNA-Sequenzierung eindeutig von den P Typ ATPase-Genen getrennt werden können.

Ist mit einem DNA-Oligonukleotid erst einmal eine bestimmte P Typ ATPase aus dem H.pylori-Genom isoliert, so kann auf Grundlage der erhaltenen, eindeutigen Sequenzinformation eine Reisolierung weiterer Kopien gezielt durchgeführt werden, wobei wiederum die bekannten Standardmethoden der Molekularbiologie zum Einsatz kommen. Dieses Vorgehen ist insbesondere dann von Vorteil, wenn nur eine partielle DNA-Sequenz einer P Typ ATPase auf einem isolierten Plasmid vorliegt.



## 1.2 Beschreibung der HP-Genbank

Die HP-Genbank wurde von Dr. Rainer Haas (Tübingen) konstruiert und zur Verfügung gestellt.

Die HP-Genbank wurde ausgehend von HP-Isolat 69A erstellt. Dazu wurde chromosomale DNA aus HP69A isoliert und mit Sau3A teilverdaut. DNA-Fragmente >3 kb wurden gelelektrophoretisch angereichert.

Als Klonierungsvektor wurde pRH160 eingesetzt (Fig. 1), der über einen Tetrazyklin-Resistenzmarker (Tet<sup>R</sup>) verfügt. Das 2.44 kb-Plasmid verfügt außerdem über eine singuläre Bgl2-Schnittstelle im Polylinkerbereich. Diese Bgl2-Stelle wurde zur Klonierung der HP-DNA-Fragmente benutzt. Die rekombinanten Plasmide wurden in *E. coli* HB101 transformiert und kloniert. Es wurden  $2 \times 10^4$  unabhängige Transformanden erhalten. Nach Amplifikation wurden 200 µl-Aliquots mit jeweils  $3.7 \times 10^6$  cfu (colony forming units) abgefüllt und gelagert. Die in das Plasmid inserierten HP-DNA-Insertionen lassen sich über einen Doppelverdau mit EcoR1 und Xho1 wieder aus dem Vektor herausschneiden.

## 1.3 Plasmid pRH439

### 1.3.1. Isolierung von pRH439

Da die DNA-Sonde I-282 auch mit *E. coli*-DNA reagiert (1.1) wurde das Screening direkt an der Plasmid-DNA durchgeführt. Dazu wurde ein Aliquot aus der Genbank in der Weise verdünnt und als Inokulum auf 20 Kultur-röhrchen verteilt, daß in jedem Röhrchen etwa 70 unabhängige Klone aus der Genbank vertreten waren.

Insgesamt wurden durch diese Vorgehensweise 1400 Klone (von den 20.000 vorhandenen) von mit Digoxigenin markiertem Oligonukleotid I-282 nach P-ATPasen durchsucht. Die 1400 Plasmide stellten bei einer durchschnittlichen Größe der HP-DNA-Insertionen von ca. 3000 bp etwa 2-3 *H. pylori*-Genomäquivalente dar.

Von den 20 "gemischten Plasmid-Kulturen" wurde jeweils eine Plasmidpräparation angefertigt. Ein Aliquot der Bakterienkulturen wurde als Glycerinkonserven weggefroren. Die Plasmidpräparationen wurden nach Restriktion mit EcoR1/Xho1 einer Southern-Blot-Analyse mit I-282 als Sonde unterzogen. Die Plasmidmischung Nr. 4 ergab dabei ein deutliches Signal. Von der entsprechenden Glycerinkonserven wurde daher ein Aliquot auf LB-Agarplatten plattiert. Von statistisch ausgewählten Kolonien wurden erneut Plasmid-Präparationen angefertigt, die wie im Primärscreen per Southern-Blot-Analytik untersucht wurden. Hierbei erwies sich die Plasmid-Präparation Nr. 39 als positiv. Dieses Vorgehen führte zur Isolierung von Plasmid pRH439.

### 1.3.2. Sequenz-Analyse des isolierten Plasmids pRH439

Das Plasmid trägt eine mit EcoRI-XhoI herausschneidbare HP-DNA-Insertion von ca. 3,4 kb Länge. DNA-Sequenzierung führte zu dem Resultat, daß das HP-spezifische DNA-Fragment einen ORF (Open Reading Frame) von 2058 bp enthält. Dieser kodiert für ein Protein von 686 Aminosäuren. In Fig. 2a-e ist die erhaltene DNA-Sequenz und die daraus resultierende Aminosäure-Sequenz wiedergegeben.

Die Polypeptidkette enthält in Position D-388 (Asp-388) bis T-394 (Thr-394) die für die Isolierung des Gens benutzte konservative Box, die die für P-ATPasen charakteristische P-Stelle beinhaltet. Die Hydrophobizitätsanalyse zeigt eine ganze Reihe von möglichen transmembranen Helices, die für die spezielle Membran-Topologie des Enzyms notwendig und für P-ATPasen und andere Membranenzyme charakteristisch sind.

Ein besonderes Merkmal der isolierten HP-ATPase, abweichend von den bisher isolierten P-ATPasen, ist die hohe Konzentration von Cystein- und Histidin-Resten. Cys- und His-Reste treten massiv auf im Bereich von AS-Position 420 bis 550. Außerdem zeichnet sich das Enzym durch eine N-terminale HIHNLDCPDC Ionen-Bindestelle aus und besitzt ein internes CPC-Motif.

In der helicobacter-spezifischen DNA-Insertion des Plasmids pRH439 wurde vor dem ATPase-Gen (ATPase-439) ein zusätzlichen ORF gefunden, der durch die Klonierungsstelle abgebrochen wird und deshalb unvollständig ist. Die Helicobacter-spezifische DNA-Insertion von pRH439 überlappt aber am 5'-Ende mit der Insertion von Plasmid pRH514, so daß sich mit Hilfe des Plasmids pRH514 der ATPase -assoziierte ORF vervollständigen ließ.

## 1.4. Plasmid pRH514

### 1.4.1. Isolierung von pRH514

Dieses Plasmid wurde aus der H.pylori 69A-Genbank isoliert wie für pRH439 beschrieben. Allerdings wurde als Sonde das DNA-Oligonukleotid I-407 eingesetzt.

Sequenzierung der H.pylori-spezifischen DNA-Insertion von pRH514 ergab, daß diese 3097 bp umfaßt. Die DNA-Sequenz sowie die Aminosäuresequenz des kompletten ORF ist in Fig. 3 gezeigt.

#### 1.4.2 Sequenz-Analyse des isolierten Plasmids pRH514

Die DNA-Sequenz wurde mittels DNA-Sequenzierung bestimmt. Es stellte sich heraus, daß die pRH514-Insertions-DNA die DNA-Sequenz des Plasmids pRH439 nach 5' verlängert. Dabei wird das in pRH439 durch die Klonierungsstelle unterbrochene Leseraster, das dem P-Typ-ATPase- vorausgeht, komplettiert. Da dieses der ATPase vorgeschaltete Gen für ein Proteinprodukt kodiert und auf dem Chromosom von *H.pylori* 69A offensichtlich benachbart zur beschriebenen P-Typ-ATPase lokalisiert ist, wurde das abgeleitete Genprodukt als ATPase assoziiertes Protein (AA-Protein, kurz: AAP) bezeichnet.

Der AAP-kodierende ORF von pRH514 sagt eine Aminosäurekette bestehend aus 506 Resten voraus. 24 bp stromabwärts schließt sich der ORF für die ATPase 439 an, der auf pRH514 allerdings im 3'-Bereich unvollständig ist.

Das AA-Protein ist durch eine signifikante Homologie zu Response-Regulatoren von bakteriellen Zweikomponenten-Systemen charakterisiert. Diese Systeme der Signaltransduktion setzen sich in der Regel aus einer membranständigen Sensorkinase und einem cytosolischen Response-Regulator-Protein zusammen. Das AAP von *H.pylori* zeigt über die gesamte Aminosäuresequenz eine Identität von ca. 15-20% mit *E.coli* NtrC und *K.pneumoniae* NifA, zwei bekannten Response-Regulator-Proteinen.

*H.pylori*-AAP läßt sich entsprechend den bekannten Response-Regulatoren in drei Domänen untergliedern: eine regulative N-terminale Domäne mit einem Aspartat-Rest in Position 56, eine zentrale Domäne mit einem sogenannten Walker A ATP-Bindungsmotif (Gly-Ser-Pro-Gly-Cys-Gly-Lys-Ser) und die C-terminale Domäne mit Helix-Turn-Helix-Motiven, die auf die Möglichkeit zur Interaktion mit DNA hindeuten. Auffallend ist, daß die zentrale Domäne von AAP vier symmetrisch angeordnete Cys-Reste enthält (Positionen 358, 360, 370, 372).

#### 1.5. pRH948

##### 1.5.1. Isolierung von pRH948

Dieser DNA-Klon wurde mittels DNA-Sonde I-408 aus der *H.pylori*-Genbank isoliert. Die Isolierungsstrategie ist unter 1.3.1. beschrieben.

##### 1.5.2. Sequenz-Analyse des isolierten Plasmids pRH948

Das Plasmid enthält eine *H. pylori*-spezifische DNA-Insertion von ca. 4,5 kbp. Die DNA-Sequenz wurde mittels DNA-Sequenzierung bestimmt. Die DNA-Sequenz enthält 4 komplette ORFs (ORFs 2-5) sowie 2 unvoll-

ständige, terminale ORFs (ORF1 und 6). In Fig. 4 ist die komplette DNA-Sequenz und die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der entsprechenden ORFs gezeigt. ORF 4 kodiert für eine weitere P Typ ATPase von *H. pylori*, hier genannt ATPase-948.

#### 1.5.3. Detaillierte Beschreibung von ATPase-948 (ORF 4)

Die DNA enthält beginnend ab DNA-Basen-Position 1872 einen ORF (open reading frame, offenen Leserahmen), der für ein aus 741 Aminosäuren bestehendes Protein kodiert. Das Protein verfügt über die für P-Typ-ATPasen geforderte konservierte Phosphorylierungsstelle. Sequenz-Motive, die für P-Typ-ATPasen, insbesondere aus der Familie der Metallionen-transportierenden p-Typ-ATPasen charakteristisch sind, sind in der pRH948-DNA vorausgesagten Aminosäure-Sequenz enthalten

Das Protein ist gekennzeichnet durch:

- eine konservierte Phosphorylierungsstelle
- eine ATP-Bindungsregion
- eine N-terminale Cys-x-x-Cys-Sequenz
- eine Cys-Pro-Cys-Sequenz, assoziiert mit einer Region hydrophober Aminosäuren.

Die DNA-Sequenz und die daraus abgeleitete Aminosäure-Sequenz der von pRH948 kodierten P-Typ-ATPase ist in Fig. 5a ..... gezeigt.

Diese Sequenzmotive wurden auch in der vorstehend beschriebenen pRH439-kodierten, helicobacter-spezifischen P-Typ-ATPase gefunden.

ATPase948 zeigt Sequenzähnlichkeiten insbesondere mit ATPase439 aus *H. pylori*, den CopA/B-ATPasen aus *Enterococcus hirae*, der Cd-Pumpe aus *Staphylococcus aureus* (ca. 30 % Sequenz-Identität).

Die 607 C-terminalen Aminosäuren zeichnen sich durch eine 93,7 %ige Sequenz-Identität mit der von Tylor et al. publizierten hpCopA-ATPase von *H. pylori* aus. Allerdings enthält das hpCopA-Genprodukt kein N-terminales Cys-x-x-Cys-Motif und das putativ membranassoziierte Aminosäure-Triplett Cys-Pro-Cys ist ebenfalls nicht in hpCopA vorhanden. Statt dessen findet sich in hpCopA die Sequenz Cys-Pro-Ser. Die pRH948-kodierte ATPase verfügt dagegen über eine N-terminale Region mit der charakteristischen Aminosäure-Sequenz Cys-x-x-Cys.

Das Gen für ATPase-948 kann wie das der ATPase-439 in heterologer Form exprimiert werden. Dazu eignen

sich die in Kapitel 2 und 3 im Detail beschriebenen Methoden und Strategien. ATPase-948 eignet sich insbesondere auch als Basis für das im weiteren am Beispiel der ATPase-439 beschriebene Wirkstoff-Screening-Modell.

#### 1.5.4. Beschreibung der weiteren auf pRH948 lokalisierten ORFs

Die Aminosäuresequenzen der verschiedenen ORFs sind der Fig. 4 zu entnehmen.

ORF 1 kodiert für den C-terminalen Teil eines Proteins und stellt daher eine C-terminale Partialsequenz dar. Diese umfaßt 309 Aminosäuren beginnend mit einem Aspartat-Rest und endend mit einem Serin. Die Sequenz startet unmittelbar mit dem Beginn der Insertions-DNA. Das abgeleitete Proteinprodukt zeigt in Homologie-Untersuchungen signifikante Homologie mit sogenannten AAA-Typ-ATPasen, zu denen auch das gut untersuchte FtsH-Protein von *E.coli* gehört.

ORF 2 startet an Basen-Position 1162 der DNA-Sequenz von pRH948. Hier liegt das ATG-Startcodon für Methionin. Dieser ORF bestehend aus insgesamt 237 Triplets endet an Position 1872 mit der letzten Base des terminalen Alanin-Triplets. Das abgeleitete Protein zeichnet sich durch signifikante Homologie zu bakteriellen Phosphatidyl-Serin-Synthetasen (PSS) aus.

ORF 3 ist rasterversetzt innerhalb von ORF 2 lokalisiert. Er beginnt mit der Base A in Position 1710 als Teil des ATG-Startcodons und kodiert für ein Peptid von 48 Aminosäuren.

ORF 4 kodiert für die oben bereits beschriebene P-Typ-ATPase-948. Dieser ORF beginnt an Position 1872 der DNA-Sequenz. Die letzte Base des für das PSS-homologe Protein kodierenden ORFs repräsentiert damit gleichzeitig den Startpunkt der kodierenden Sequenz für die P-Typ ATPase. ORF 4 endet an Position 4094. Es folgt unmittelbar das terminierende TGA-Stopcodon.

ORF 5 folgt unmittelbar auf das TGA-Stopcodon der P-Typ ATPase beginnend mit einem ATG-Startcodon (Basen-Positionen 4098-4100). Der ORF sagt ein Protein von 66 Aminosäuren voraus. Das Protein ist charakterisiert durch ein in der N-terminalen Region gefundenes CxxC-Motif, CNHC. Es ist homolog im Vergleich mit dem CopZ-Protein, das in *Enterococcus hirae* ein Bestandteil des Cop-Operons darstellt.

ORF 6 ist wie ORF 1 unvollständig vorhanden. Er beginnt an Position 4401 und terminiert nach 27 Triplets terminiert mit dem Ende der helicobacter-spezifischen DNA-Sequenz in pRH948.

## 2. Heterologe Expression von Helicobacter-Genen

Die isolierten und charakterisierten *H.pylori*-Gene lassen sich in heterologen Systemen (Bakterien, Hefen, Eukaryonten) vollständig oder in Teilen exprimieren. Für bakterielle Systeme eignen sich unter anderem die herkömmlichen Expressionsplasmide mit bakteriellen Promotoren wie z.B. *lac*, *tac* und *trp*. Als Wirtszellen eignen sich insbesondere *E.coli* K12 - Wirtszellen und deren Derivate. Die heterologe Expression von *H.pylori*-Genen eignet sich zur Identifizierung und Entwicklung von helicobakteriziden Wirkstoffen sowie zur Induktion von Antikörpern und Antiseren.

Die funktionelle Expression von essentiellen *H.pylori*-Genen in *E.coli* eignet sich zum Aufbau von Screening-Modellen, mit deren Hilfe spezielle *H.pylori*-Enzym-Aktivitäten selektiv gemessen werden können. Solche Modelle können zur Identifizierung und Entwicklung von Substanzen eingesetzt werden, die die klonierten und heterolog exprimierten *H.pylori*-Proteine in ihrer Funktion inhibieren und damit potentiell als helicobakterizide Drugs Bedeutung in der Therapie von helicobakter-assoziierten Krankheiten haben.

Das experimentelle Vorgehen zur heterologen Expression von *H.pylori*-Genen in *E.coli* zum Aufbau für ein Screening-Modell wird im folgenden am Beispiel der P-Typ ATPase-439, kodiert von pRH439, gezeigt.

Dieses Vorgehen führt zur funktionellen und meßbaren Expression von Helicobacter-Genen in einer geeigneten Wirtszelle. Die Meßbarkeit der Helicobacter-spezifischen Aktivität beruht auf einer Veränderung der gesamtmolekularen Leistung der Wirtszelle.

Es wurde nun gefunden, daß die Expression einer *H.pylori*-P-Typ ATPase in *E.coli* die metabolische Aktivität signifikant verändert. Das im nachfolgenden beschriebene System zeigt, daß die durch die Expression des *H.pylori*-Genprodukts veränderte metabolische Leistung der Wirtszelle, die meßtechnisch erfaßt werden kann, zur Identifizierung von Inhibitoren der spezifischen Helicobacter-Aktivität genutzt werden kann. Wirkstoffe, die die isolierte Helicobacter-Aktivität beeinflussen, werden detektiert, indem diese die herbeigeführte Veränderung in der metabolischen Leistung der Wirtszelle verhindern bzw. aufheben.

Die für die Helicobacter-ATPase kodierende Region wurde mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) aus Plasmid pRH439 amplifiziert und in verschiedene bakterielle Expressionsvektoren mit *E.coli* *Tac*-, *Tre*- oder *Trp*-Promotoren inseriert und kloniert. Hierzu zählen u. a. die Plasmide pTI2-1, p*TreHisA* und p*Trp233*. In diesen Vektoren steht das *H.pylori*-P-Typ ATPase-Gen unter der Kontrolle der angegebenen Promotoren. Die konstruierten Plasmide wurden in *E. coli* K12-Stämme transformiert. Zur Expression wurden die rekombinanten *E. coli*-Stämme angezüchtet und vor dem Erreichen der maximalen Zelldichte mit dem Induktor versetzt (IPTG, Isopropyl-Thiogalaktosid, für *Tac*- und *Tre*-Promotoren bzw.  $\beta$ -IAA, Indollessigsäure, für *Trp*-Promotoren). Das

Proteinprofil der E. coli-Stämme wurde vor und nach der Induktion gelelektrophoretisch analysiert. Nach Geninduktion tritt in den rekombinanten E. coli-Stämmen eine neue Proteinbande auf, die bei ca. 70 kDa im Gel läuft. Das unten beschriebene Vorgehen zur Konstruktion von funktionellen Expressionsvektoren, die die Synthese von rekombinanten Helicobacter-Proteinen in E.coli erlauben, stellt eine Basis bzw. Grundlage für den Aufbau eines Screening-Modells dar. Aufbau und Funktion des Screening-Modells ist im nächsten Kapitel im Detail beschrieben.

### 3. Beschreibung des Screening-Modells

Das Modell besteht aus einem rekombinanten E. coli-Stamm, der auf einem Expressionsplasmid die in ihrer Aktivität kontrollierbare Gensequenz einer H. pylori-P-Typ ATPase trägt. Das Medium, in dem die Messung erfolgt, muß so zusammengesetzt sein, daß hierin die Aktivität von HP-ATPasen induziert und gemessen werden kann. Die Aktivität von in die Wirtszelle eingeschleusten ATPasen hat Einfluß auf die allgemeine metabolische Aktivität der Wirtszelle und ist daher einer Messung zugänglich. Die durch die P-Typ ATPase-Aktivität induzierte Veränderung in der metabolischen Aktivität der rekombinanten Wirtszelle läßt sich durch die Inhibierung der P-Typ ATPase-Aktivität verhindern. Letzteres ist Basis für den Einsatz des Modells zum Screening und zur Optimierung von Substanzen.

Die Funktion des Modells wird im folgenden am Beispiel des E. coli-Stamms PY25 beschrieben.

#### 3.1. Detaillierte Beschreibung der Modell-Komponenten

##### 3.1.1. Wirtszelle

Wirtszelle ist E. coli MM294. Dieser Stamm ist ein E. coli K12-Abkömmling und daher als nicht humanpathogen eingestuft.

##### 3.1.2. ATPase-Expressionsplasmid

Expressionsvektor ist Plasmid PY25. Dieses setzt sich zusammen aus dem Plasmid pTI2-1 und dem HP-P-Typ ATPase-Gen 439.

pTI2-1 wurde ausgehend von den Plasmiden pKK223-3 und pGex2T, die beide von Pharmacia bezogen wurden, konstruiert. Zunächst wurde die PstI-Schnittstelle im Polylinker von pKK deletiert. Hierzu wurde pKK mit PstI

geschnitten und die Enden mit T4-DNA-Polymerase behandelt. Der Vektor wurde anschließend mit SmaI verdaut, religiert und nach Transformation in *E. coli* HB101 kloniert. Klonierungsprodukt ist pKK $\delta$ BamHI. Das Amp<sup>R</sup> in pKK $\delta$ BamHI wurde gegen das Amp<sup>R</sup>-Gen aus pBR322 ausgetauscht, da letzteres über eine interne PstI-Schnittstelle verfügt. Dazu wurde pKK $\delta$ BamHI und ebenso pBR322 mit PvuI und NdeI doppelverdaut. Aus dem pBR322-Verdau wurde die kleinere Bande (ca. 1,45 kb) und aus pKK $\delta$ Bam die große Bande (ca. 3 kb) isoliert. Die beiden DNA-Fragmente wurden ligiert und in *E. coli* HB101 kloniert. Klonierungsprodukt ist pKK(Pst) $\delta$ Bam.

pKK(Pst) $\delta$ BamHI wurde mit PstI und SspI verdaut. Die beiden kleinen DNA-Banden von ca. 620 bzw. 560 bp wurden aus einem Agarosegel isoliert. pGex2T wurde ebenfalls mit der Enzymkombination SspI x PstI verdaut. Nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel wurde das große 3,2 kb-DNA-Fragment isoliert. Die drei isolierten DNA-Fragmente aus pKK(Pst) $\delta$ Bam und pGex2T wurden ligiert und in *E. coli* HB101 kloniert. Klonierungsprodukt ist pTI2. Dieser Vektor enthält einen Tac-Promotor, ein Amp<sup>R</sup>-Gen sowie das lac-Repressor-Gen lacI<sup>q</sup>. Plasmide mit vergleichbarem Aufbau können z. B. von Pharmacia bezogen werden (pTrec 99A).

pTI2 wurde mit Enzymkombination EcoRI/Hind3 linearisiert und mit dem doppelsträngigen DNA-Oligonukleotid MCS1 (Multi Cloning Site 1), das über die entsprechenden kompatiblen EcoRI bzw. Hind3 verfügt, ligiert. Nach Ligation und Transformation wurde Plasmid pTI2-1 erhalten. Hier ist MCS1 hinter P<sub>Tac</sub> (Tac-Promotor) in die EcoRI Stelle aus pKK kloniert. MCS1 hat nach Klonierung in pTI2-1 die Sequenz 5'-GAATTCGTAG GAAGCTCATAT GGTCTGACTC TAGACCCGGG CTGCAGAAGCTT-3', die für die Klonierung die Restriktionsstellen EcoRI, NdeI, SalI, XbaI, SmaI, PstI und Hind3 bietet. In Fig. 5 ist eine Plasmidkarte des konstruierten Expressionsvektors pTI2-1 gezeigt.

Für die Insertion des HP-ATPase-Gens 439 in pTI2-1 wurden DNA-Primer I-404 und I-402 mit den Sequenzen 5'-ACCGA CTTGA ATTCA TGCAA GAATA CCACA TT-3' (I-404) und 5'-CTGCA ACTCA AGCTT AAGCT CTCAT TCGCG GCAT-3' (I-402) synthetisiert. I-404 korrespondiert mit den ersten 6 Aminosäure-Tripletts des ATPase-Gens und enthält vorgelagert eine EcoRI-Stelle ("Sense"-DNA-Oligonukleotid). I-402 korrespondiert mit den letzten 6 Aminosäure-Tripletts und enthält nachgeschaltet ein TAA-Stopcodon sowie eine Hind3-Stelle ("Antisense"-DNA-Oligonukleotid). Mit diesen DNA-Oligonukleotiden wurde die für die HP-ATPase kodierende Region aus pRH439 (1.3) mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit EcoRI und Hind3 geschnitten, um die Klonierungsenden freizusetzen, und über ein Agarosegel gereinigt. pTI2-1 wurde mit der gleichen Enzymkombination verdaut (EcoRI und Hind3). Plasmid und PCR-Produkt wurden ligiert und nach Transformation in *E. coli* MM294 kloniert. Klonierungsprodukt ist Plasmid PY25. Die DNA-Sequenz des inserierten ATPase-Gens wurde mittels DNA-Sequenzierung verifiziert. Der rekombinante *E. coli*-Stamm wird als *E. coli* PY25 bezeichnet. In *E. coli* PY25 steht das HP-ATPase-Gen unter



Kontrolle des Tac-Promotors. Der Aufbau des Vektors PY25 ist in Fig. 5 angegeben.

### 3.1.3 Messeinrichtung zur Bestimmung der metabolischen Aktivität von E. coli PY25

Mit Hilfe eines Cytosensor-Microphysiometers (Fa. Molecular Devices, Gräffelfing) ist es möglich, die metabolische Aktivität von Zellen über ihre Acidifizierungsrate zu messen und aufzuzeichnen. Die Acidifizierungsrate ist definiert als die Rate, mit der das Medium durch die zelluläre Stoffwechselaktivität angesäuert wird. Das biologische Arbeitsprinzip des Cytosensors beruht auf der Tatsache, daß die  $H^+$ -Konzentration in der unmittelbaren Umgebung von lebendenden Zellen von der metabolischen Aktivität abhängt. Dem Cytosensor liegt ein lichtgesteuerter Sensor (Siliziumchip) zugrunde, der als hochsensitiver und schneller pH-Detektor wirkt. Der Sensor steht mit der Meßkammer, in der die Zellen unter einem manipulierbaren Fluß von Medium inkubiert werden, in direktem Kontakt. Über den Sensor ist eine Spannung angelegt, wobei der Stromfluß abhängig von der Protonen-Belegung der Oxynitritschicht des Silikonchips ist (McConnel et al., Science 257, 1906-1912, 1992). Der Sensor erfaßt geringste metabolische Veränderungen von Zellen, die sich in der Meß- bzw. Sensor-kammer befinden. Der Zusatz von Medien, Nährstoffen und Testsubstanzen wird über ein computergesteuertes System gesteuert. Es können 8 Proben parallel gemessen werden.

## 3.2. Messung der metabolischen Aktivität

### 3.2.1. Cytosensor Versuchs-Medium

Die Versuche im Cytosensor wurden in BSSGG-Medium durchgeführt. Hierbei steht BSS für "Balanced Salt Solution", eine schwach phosphatgepufferte Ionenlösung, und GG für den Zusatz von Glucose und Glutamin als Nährstoff- und Energiequelle.

#### BSSGG-Zusammensetzung (pH 7,4)

138	mM NaCl
5	mM KCl
0,81	mM $Na_2HPO_4$
0,11	mM $NaH_2PO_4$
1,3	mM $CaCl_2$
0,5	mM $MgCl_2$
10	mM Glucose
1	mM Glutamin

Als Quelle für Ammoniumionen und Schwefel wird dem Medium noch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  zugesetzt (Endkonzentration 10 mM).

### 3.2.2. Vorbereitung der Zellen

M9-Minimalmedium (Molecular Cloning, Maniatis et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) wird mit rekombinanten E. coli beimpft und über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C bebrütet. Der rekombinante Stamm ist E. coli PY25. Als Kontrollstamm wird E. coli PT12-1, der das Plasmid ohne die Insertion der ATPase trägt ("Leervektor"), eingesetzt.

Am nächsten Tag wurden 70 µl Zellsuspension mit 30 µl aufgeschmolzener Agarose (Molecular Devices) gemischt und jeweils 10 µl auf die Membran eines Einsatzes für die Cytosensor-Meßkammer getupft. Zur Aushärtung der Agarose wurden die Einsätze für 20-40 min. bei +4°C inkubiert und dann entsprechend den Vorschriften des Herstellers in die Sensorkammern des Cytosensors überführt. Als Medium diente BSSGG.

### 3.2.3. Vorbereitung des Cytosensors

Die Meßkammern des Cytosensors wurden vor Einsetzen der Sensorkammern mit den Zellen bei 50 %iger Pumpleistung mit BSSGG geflutet. Nach 10 min wurden die vorbereiteten Sensorkammern mit den Agarosefixierten Zellen eingesetzt. Es wurden folgende Parameter definiert:

#### Temperatur:

- Meßkammer: 37°
- Debubblers Δ: 6°C

#### Pump- und Meßzyklus

- Pumpphase

	Start	Stop	Speed
1st Interval	00:00:00	00:00:40	30 %
	(h:min:s)		

- Rate Measurement (Messung der Acidifizierungs- bzw. Alkalisierungsrates)

Start	Stop
00:00:43	00:00:58

Die Pumpe stoppt während der Meßphase (Speed = 0%).

- gesamter Zyklus (total cycle). 00:01:00

Es folgt die Kalibrierung des Geräts, also die Eichung der Sensorkammern bezüglich der Aktivität der eingesetzten Zellen auf Grundlage der eingestellten Parameter. Der weitere Versuchsablauf erfolgt genau nach den Angaben des Herstellers. Raw- und Rate-Daten werden aufgezeichnet und abgespeichert. Die Rate-Daten geben den tendenziellen Verlauf der zellulären Aktivität während der Meßphasen wieder (Rate Measurements). Hier läßt sich ablesen, inwieweit es zu induzierten Veränderungen im Metabolismus der Zellen kommt, die zu Veränderungen in der Oberflächenladung an der Oxynitritschicht des Sensors führen. Die Rate-Daten sind angegeben in  $-\mu\text{Volt/s}$ .

### 3.2.4. Durchführung von Experimenten

#### 3.2.4.1. Messung der Aktivität von *E. coli* PY25 und *E. coli* PTI2-1:

##### Einfluß der HP-ATPase-Aktivität

In Fig. 4 sind die Rate-Daten der beiden rekombinanten *E. coli*-Stämme *E. coli* PY25 (mit HP-ATPase) und PTI2-1 (ohne HP-ATPase) in BSSGG supplementiert mit 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  gezeigt. Beide Stämme zeigen zunächst ein ausgeprägtes Acidifizierungsverhalten. *E. coli* PY25 ist in Meßkanal F, Stamm PTI2-1 in Meßkanal B gezeigt. Bei Zugabe des Induktors Isopropyl-Thiogalaktosid (IPTG, Endkonzentration 1  $\mu\text{M}$ ) für die Aktivierung des Tac-Promotors liegen in diesem Beispiel beide Stämme bei einer Rate von ca.  $-800 \mu\text{Volt/s}$ . Etwa 5 min nach IPTG-Zugabe zeigt nur *E. coli* PY25 eine drastisch abfallende Acidifizierungsrate, die im Minimum bei ca.  $100 \mu\text{Volt/s}$  liegt und damit einer leichten Alkalisierung gleichkommt. Die verzögerte Wirkung der IPTG-Induktion ist durch die zunächst stattfindende Biosynthese der HP-ATPase zu erklären.

Der Einbruch in der Acidifizierungsrate von *E. coli* PY25 ist unter diesen Versuchsbedingungen nur in Gegenwart von  $\text{NH}_4^+$  zu beobachten. Wird gleichzeitig mit IPTG dem Medium auch Tetrazyklin, ein Inhibitor der bakteriellen Proteinbiosynthese zugefügt, tritt keine Veränderung in der metabolischen Aktivität von Stamm PY25 auf.

#### 3.2.4.2. Hemmung des IPTG-Effekts durch ortho-Vanadat

Es ist bekannt, daß ortho-Vanadat im unteren  $\mu$ -molaren Konzentrationsbereich P-Typ ATPasen hemmt. Fig. 5 zeigt diesen inhibitorischen Effekt. Die Acidifizierungsrate von *E. coli* PY25 wurde zunächst im Cytosensor in BSSGG supplementiert mit 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  aufgezeichnet (Meßkammern F,G,H). In F und H wurden die Zellen dabei Vanadat bei einer Endkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  ausgesetzt. G enthielt keinen Inhibitor. Nach 3,5

Std. Vorinkubation wird umgeschaltet in BSSGG, 10 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  mit 1  $\mu\text{M}$  IPTG. Dabei ist in G zusätzlich 10  $\mu\text{M}$  Vanadat anwesend (vorher ohne Vanadat), ebenso in H (vor Induktion anwesend). In F ist mit Induktion kein Vanadat anwesend, befand sich aber im Medium der Vorinkubation. Wie in Fig. 5 (G) zu sehen, tritt nur in Probe G die induzierte Hemmung der Acidifizierung auf. Proben H und F, die vorgelegt 10  $\mu\text{M}$  Vanadat erhielten, werden nicht gehemmt, d.h. die Acidifizierungsrate nimmt im Gegensatz zu Probe G nicht signifikant ab.

Dieser Versuchsaufbau zeigt die Wirkung des Vanadats als Inhibitor der induzierten P-Typ ATPase und zeigt, daß der rekombinante E. coli auf dieser Basis ein Screening nach Substanzen, die mit der exprimierten ATPase-Aktivität interagieren, ermöglicht.

#### Figuren-Beschreibung

- Fig. 1 stellt die Plasmid-Karte von pRH160 dar. Das Plasmid enthält ein Tetracyclinresistenz-Marker. Die Lage der Restriktionsstellen für EcoRI, BglII, XhoI, KpnI, SmaI, XbaI, ClaI, SalI, EcoRV, BamHI, SphI, NruI und PstI ist angegeben. Die durch partielle Verdauung von genomischer H. pylori DNA mit Sau3A erhaltenen DNA-Fragmente wurden in die BglII Restriktionsposition des Plasmids kloniert.
- Fig. 2a-e zeigen die DNA-Sequenz des vollständigen pRH439 Xho-EcoRI Inserts und den abgeleiteten ORF (open reading frame) von HP-ATPase. Die DNA-Sequenz startet mit dem C der XhoI (CTCGAG) Erkennungsstelle in Position 1 und endet mit dem C der EcoRI (GAATTC) Restriktionsstelle in Position 3410. Der ORF, der für eine H. pylori P-Typ ATPase mit 686 Aminosäuren codiert, liegt zwischen Position 1219 mit dem A des ATG-Startcodons und Position 3275 mit dem T des GCT-Alanin-Codons. Auf den ORF folgt ein TAA als Stopcodon für die Translation. Die vorhergesagte Aminosäuresequenz ist unterhalb der DNA-Sequenz angegeben. Die Konsens-Sequenz, die die Phosphorylierungsstelle (Asp-388) enthält, ist unterstrichen.
- Fig. 3a-f zeigen die DNA-Sequenz des vollständigen pRH514 EcoRI-XhoI Inserts und die abgeleiteten Aminosäure-Sequenz des kompletten ORFs. Aminosäuresequenzen sind im Einbuchstaben-Code unter der kodierenden Region angegeben. Der vollständige, 5'-gelegene ORF kodiert ein Protein von 506 Aminosäuren mit signifikanter Homologie zu bakteriellen Response-Regulatoren. pRH514 überlappt mit dem DNA-Klon pRH439, der das Gen für eine P-Typ ATPase trägt. pRH514 verfügt über den 5'-Teil des ATPase-Gens 439. Da der vollständige ORF von

pRH514 der ATPase vorangestellt ist, wurde das auf pRH514 kodierte Response-Regulator-Protein als ATPase-Assoziiertes-Protein (AAP) bezeichnet.

Fig. 4a-i

zeigen die vollständige DNA-Insertions-Sequenz des DNA-Klons pRH948 aus der H.pylori-Genbank. Die terminalen Nukleotide, die durch Unterstreichung hervorgehoben sind, korrelieren noch mit Vektor-DNA. Die nicht-unterstrichene DNA-Sequenz stellt die klonierte Helicobacter-DNA von Plasmid pRH948 dar. Die H.pylori-spezifische DNA-Sequenz umfaßt insgesamt 6 ORFs. Davon sind die beiden äußeren unvollständig, da diese von den Klonierungsstellen unterbrochen vorliegen und damit in die Vektor-DNA-Sequenz übergehen. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind im Einbuchstaben-Code unter der DNA-Sequenz angegeben, wobei alle 6 ORFs berücksichtigt wurden. Lage, Art und Beschaffenheit der ORFs sind im Text beschrieben. ORF 4 kodiert für die P-Typ ATPase-948

Fig. 5

Plasmid-Karte von PY-25. Grundvektor ist pTI2-1. Dieser enthält einen tac-Promotor (P<TAC>), ein Ampicillin-Resistenz-Gen (AP<R>) sowie ein lacI<sup>q</sup>-Gen (LACIQ), das den lac-Repressor exprimiert. Hinter den tac-Promotor ist das P-Typ ATPase-Gen (ATPASE) aus pRH439 über EcoRI/HindIII-Restriktionsstellen kloniert. Der Vektor eignet sich zur funktionellen Expression von Helicobacter-Genen in E.coli. Die Lokalisation der vorhandenen singulären Schnittstellen von EcoRI, Hind3 und PstI sind angegeben.

Fig. 6

zeigt die erhaltenen Acidifizierungsraten für die Expression von HP-ATPase in rekombinantem E. coli. Die Sensorkammer B enthält rekombinante E. coli mit Plasmid pTI2-1 als Kontrollvektor. Die Sensorkammer F enthält rekombinante E. coli mit dem Plasmid PY25 mit inseriertem HP-ATPase-Gen. Die Zellen wurden wie unter 5.2.4.1 beschrieben inkubiert. Nach zwei Stunden wurde dem Medium IPTG hinzugefügt. In Gegenwart von Plasmid PY25 ist die Acidifizierungsrate von E. coli stark vermindert.

Fig. 7

zeigt den Einfluß von ortho-Vanadat auf die Acidifizierungsrate. Die Sensorkammern F, G und H enthalten E. coli mit Plasmid PY25. In den Kamnern F und H wurde dem Medium vor der Induktion mit IPTG ortho-Vanadat zugegeben. Nach 3,5 Stunden wurde IPTG (F) bzw. IPTG in Gegenwart von 10 µM ortho-Vanadat dem Medium zugefügt. In Zellen, die mit ortho-Vanadat vorinkubiert waren (F, H), wurde die durch IPTG induzierte Reduktion der Acidifizierungsrate nicht beobachtet.

Patentansprüche

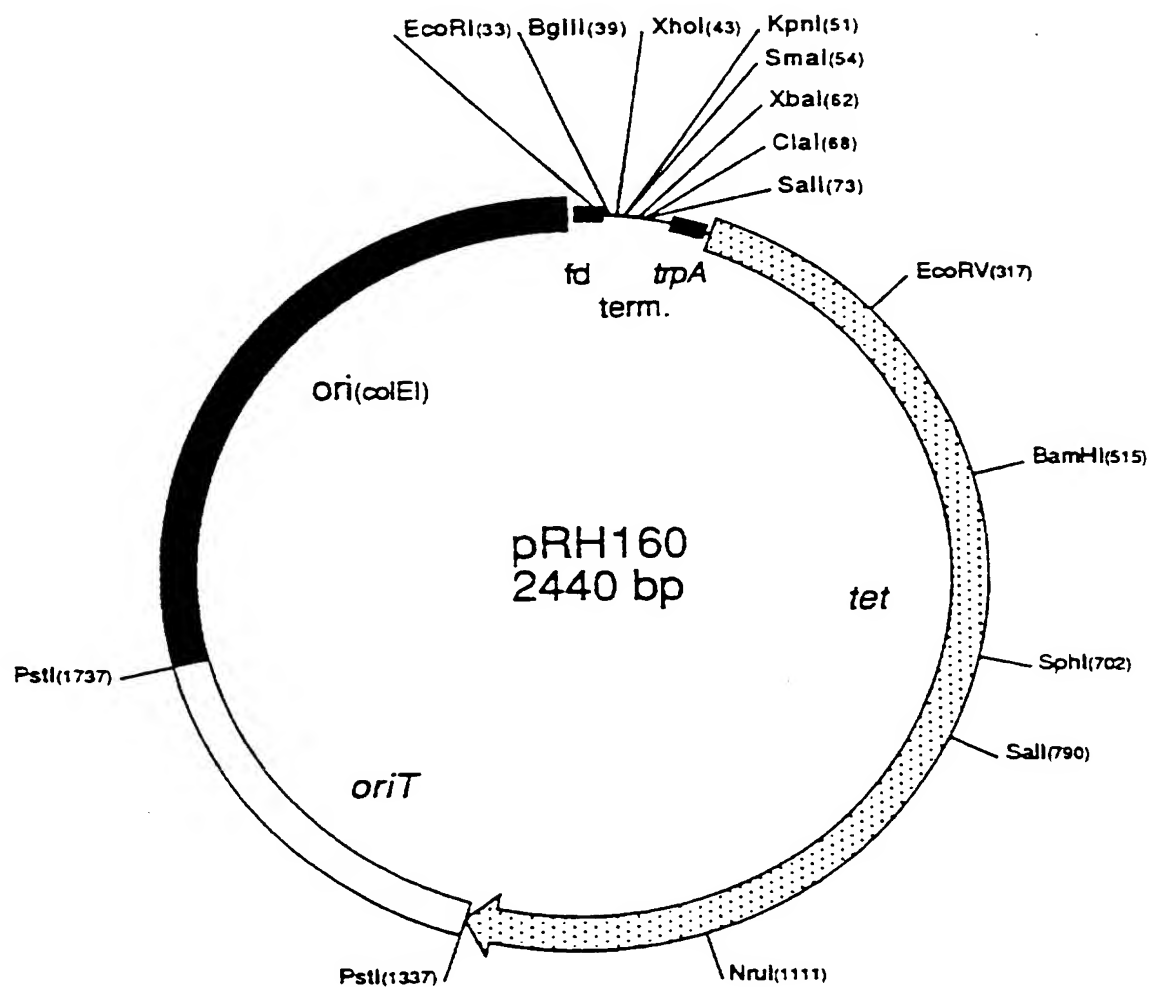
1. Screening-Modell zur Bestimmung der die P-Typ ATPase-Aktivität von *Helicobacter* hemmenden Wirkung von Substanzen umfassend
  - a) einen rekombinanten Organismus bestehend aus mit mindestens einem über einen Promotor steuerbaren P-Typ ATPase-Gen transformierten Wirtszellen,
  - b) einen Induktor zur Genaktivierung der P-Typ ATPase,
  - c) Kationen, welche die Stoffwechselaktivität des rekombinanten Organismus nur in Gegenwart von *Helicobacter*-P-Typ ATPase beeinträchtigen, und
  - d) eine Meßeinrichtung zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität des rekombinanten Organismus.
2. Screening-Modell nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirtszellen *E. coli*-Zellen verwendet werden.
3. Screening-Modell nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß als Wirtszellen *E. coli* K12-Abkömmlinge, vorzugsweise *E. coli* MM294, verwendet werden.
4. Screening-Modell nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Promotoren Tac-, Trc- oder Trp-Promotoren verwendet werden.
5. Screening-Modell nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß als Induktoren IPTG im Falle von Tac- und Trc-Promotoren und  $\beta$ -IAA im Falle von Trp-Promotoren verwendet werden.
6. Screening-Modell nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Kationen Ammoniumionen zugegen sind.
7. Screening-Modell nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich Energie- und/oder Nährstoffquellen zugegen sind.
8. Screening-Modell nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß Aminosäuren, vorzugsweise Glutamin, und/oder Glucose zugegen sind.
9. Screening-Modell nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Meßeinrichtung zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität ein Cytosensor-Microphysiometer verwendet wird.
10. Verfahren zum Screenen von die P-Typ ATPase-Aktivität von *Helicobacter* hemmenden Substanzen,

dadurch gekennzeichnet, daß man die Stoffwechselaktivität eines rekombinanten Organismus, bestehend aus einer mit mindestens einem über einen Promotor steuerbaren P-Typ ATPase-Gen aus *Helicobacter* transformierten Wirtszelle, bei eingeschaltetem P-Typ ATPase-Gen vor und nach Zugabe von Kationen, welche die Stoffwechselaktivität des rekombinanten Organismus nur in Gegenwart von *Helicobacter* P-Typ ATPase beeinträchtigen, bestimmt.

11. Gereinigte und isolierte DNA-Sequenz bestehend im wesentlichen aus dem helicobacterspezifischen ATPase-Gen 439 nach Fig. 2a-e.
12. Gereinigte und isolierte DNA-Sequenz bestehend im wesentlichen aus dem helicobacterspezifischen ATPase-Gen 514 nach Fig. 3a-f.
13. Gereinigte und isolierte DNA-Sequenz bestehend im wesentlichen aus dem helicobacterspezifischen ATPase-Gen 948 nach Fig. 4a-i.
14. Vektor enthaltend die DNA-Sequenz nach Fig. 2a-e.
15. Vektor enthaltend die DNA-Sequenz nach Fig. 3a-f.
16. Vektor enthaltend die DNA-Sequenz nach Fig. 4a-i.

1 / 2 4

FIG. 1





2 / 2 4

Fig. 2a

CTCGAGATCA AACCCAATCC TAACATTTTC CCCATGCTTT TAGACATTGC 50  
CATCAAACAC CCCCATGCTA AAGTCATTGC GCCTAAGGCT AATGAAGAGC 100  
TTTTTTCGCT CATCCCTAAT TTGCAATGCT TTTTGTGGA GCATTTTAAA 150  
GAAGCGTTAG AAATCTTACA AAACCCTGAA ATCAAAGCAG ACACCCACAC 200  
GAAAAAATA CCCTTTAAAA CGATAGAATT GAACGATAAA GAGTATTATT 250  
TTTCAGACGC CTATGCATTA GATTTTAAAG AAGTTAAGGG GCAAGCTGTC 300  
GCTAAAGAAG CCGCTTTGAT CGCTAGCGCT GGGTTTCATA ACTTGATTTT 350  
AGAGGGAAGT CCAGGGTGTG GGAAAAGCAT GATCATTAAT CGCATGCGTT 400  
ATATTTTACC TCCCTTAAGC CTGAATGAAA TCCTAGAAGC GACAAAATTA 450  
CGCATTTTAA GCGAACAAGA CAGCGCCTAT TACCCCTTAA GGAGTTTTAG 500  
AAACCCTCAC CAAAGCGCTT CAAAATCCAG CATTTTAGGC TCAAGCTCTC 550  
TAAAGAGCC AAAACCCGGC GAAATCGCCG TAGCGCATAA CGGCATGCTT 600  
TTTTTTGATG AATTGCCTCA TTTTAAAAAG GAAATTTTGG AAGCTTTAAG 650  
AGAGCCTTTA GAAAACAATA AATTGGTGGT TTCACGAGTG CATAGCAAAA 700  
TTGAATACGA AACCTCTTTT TTATTTGTGG GGGCTCAAAA CCCTTGCTTG 750  
TGTGGGAATT TACTCAGTGC GACCAAAGCA TGCCGTTGCC AAGACAGAGA 800  
AATCACGCAG TATAAAAACC GCTTGAGCGA GCCTTTTTTA GATAGGATTG 850  
ATTTGTTTGT GCAAATGGAA GAGGGGAATT ATAAAGACAC GCCGTCGCAT 900

3 / 2 4

Fig. 2b

950  
 TCTTGGACTT CAAAAGAGAT GCATCAATTA GTATTATTAG CTTTCAAACA  
 1000  
 GCAAAAATTA AGGAAACAGA GCGTTTTTAA TGGTAAGCTT AATGAAGAGC  
 1050  
 AGATAGAACG ATTTTGCCCT TTAAACGCTG AAGCAAAAAA GTTGTTAGAG  
 1100  
 CAGGCGGTTG AAAGGTTTAA TCTGTCCATG CGCTCTGTTA ATAAGGTCAA  
 1150  
 AAAGGTGCGC AGGACGATTG CGGATTTAAA CGCTTGCGAG AATATAGAAA  
 1200  
 AATCTCACAT GCTTAAAGCG CTGAGTTTAA GAAAGATTTC TTAAAAGGAT  
 1218  
 TTTTATAAGG GAGAGAAA  
 1219  
 ATG CAA GAA TAC CAC ATT CAT AAT TTG GAT TGC CCT GAT TGC GCG  
 Met Gln Glu Tyr His Ile His Asn Leu Asp Cys Pro Asp Cys Ala  
 10  
 TCT AAA TTG GAA AGG GAT TTA AAC AAA CTA GAC TAT GTG AAA AAA  
 Ser Lys Leu Glu Arg Asp Leu Asn Lys Leu Asp Tyr Val Lys Lys  
 20 30  
 GCT CAA ATC AAT TTC AGC ACC AGC AGG TTG TTT TTG GAC ACG AGC  
 Ala Gln Ile Asn Phe Ser Thr Ser Arg Leu Phe Leu Asp Thr Ser  
 40  
 GAT TTT GAA AAA GTT AAG GCT TTT ATC AAG CAG AAT GAA CCG CAT  
 Asp Phe Glu Lys Val Lys Ala Phe Ile Lys Gln Asn Glu Pro His  
 50 60  
 TTG AGC CTG TCT TTT AAA GAG GCC GCA GAA AAG CCC TTG AGT TTT  
 Leu Ser Leu Ser Phe Lys Glu Ala Ala Glu Lys Pro Leu Ser Phe  
 70  
 ACG CCA CTC ATT GTT ACG ATC GCT GTC TTT TTA GGC GCG ATT TTA  
 Thr Pro Leu Ile Val Thr Ile Ala Val Phe Leu Gly Ala Ile Leu  
 80 90  
 ATC TTA CAC CTA AAC CCT AGC CCT TTG ATT GAA AAG GCT ATG TTT  
 Ile Leu His Leu Asn Pro Ser Pro Leu Ile Glu Lys Ala Met Phe  
 100  
 TTC GTG TTG GCT TTG GTG TAT CTA GTG AGC GGT AAA GAT GTG ATT  
 Phe Val Leu Ala Leu Val Tyr Leu Val Ser Gly Lys Asp Val Ile  
 110 120  
 TTA GGG GCG TTT CGT GGG CTT AGG AAA GGG CAG TTT TTT GAT GAA  
 Leu Gly Ala Phe Arg Gly Leu Arg Lys Gly Gln Phe Phe Asp Glu  
 130

4 / 2 4

fig. 2c

AAC GCT TTG ATG CTC ATT GCG ACT ATT GCG GCT TTT TGC GTG GGG  
 AsN Ala Leu Met Leu Ile Ala Thr Ile Ala Ala Phe Cys Val Gly  
 140 150

GCT TAT GAA GAG AGC GTG TCT ATT ATG GTG TTT TAT TCA GCG GGC  
 Ala Tyr Glu Glu Ser Val Ser Ile Met Val Phe Tyr Ser Ala Gly  
 160

GAA TTT TTG CAA AAA CTC GCT ATC GCT CGC TCT AAA AAA TCC CTT  
 Glu Phe Leu Gln Lys Leu Ala Ile Ala Arg Ser Lys Lys Ser Leu  
 170 180

AAG GCT TTA GTG GAT GTC GCT CCT AAT TTG GCT TAT TTG AAA AAG  
 Lys Ala Leu Val Asp Val Ala Pro AsN Leu Ala Tyr Leu Lys Lys  
 190

GGC GAT GCG TTA GTG AGC GTT GCG CCT GAA GAT TTA AGA ATT AAT  
 Gly Asp Ala Leu Val Ser Val Ala Pro Glu Asp Leu Arg Ile AsN  
 200 210

GAC ATT GTG GTG GTG AAA GTC GGC GAA AAA GTG CCT GTG GAT GGC  
 Asp Ile Val Val Val Lys Val Gly Glu Lys Val Pro Val Asp Gly  
 220

GTG GTG ATT AAG GGC GAA AGT TTG CTA GAT GAA AGG GCG TTG AGC  
 Val Val Ile Lys Gly Glu Ser Leu Leu Asp Glu Arg Ala Leu Ser  
 230 240

GGG GAG TCT ATG CCG GTT AAT GTC AGC GAA CGC TCT AAA GTT TTA  
 Gly Glu Ser Met Pro Val AsN Val Ser Glu Arg Ser Lys Val Leu  
 250

GGG GGG AGC TTG AAT TTA AAA GCG GTC CTT GAA ATT CAA GTA GAG  
 Gly Gly Ser Leu AsN Leu Lys Ala Val Leu Glu Ile Gln Val Glu  
 260 270

AAA ATG TAT AAA GAT TCT TCT ATC GCT AAA GTG GTA GAT TTG GTC  
 Lys Met Tyr Lys Asp Ser Ser Ile Ala Lys Val Val Asp Leu Val  
 280

CAA CAA GCC ACG AAT GAA AAG AGC GAA ACC GAG AAA TTT ATC ACT  
 Gln Gln Ala Thr AsN Glu Lys Ser Glu Thr Glu Lys Phe Ile Thr  
 290 300

AAA TTT TCA CGC TAC TAC ACC CCA AGC GTT TTA TTC ATT GCG TTA  
 Lys Phe Ser Arg Tyr Tyr Thr Pro Ser Val Leu Phe Ile Ala Leu  
 310

ATG ATT GCT GTA TTA CCG CCC TTA TTT TCT ATG GGG AGC TTT GAT  
 Met Ile Ala Val Leu Pro Pro Leu Phe Ser Met Gly Ser Phe Asp  
 320 330

GAG TGG ATT TAT AGG GGG CTT GTG GCT TTA ATG GTG AGC TGC CCT  
 Glu Trp Ile Tyr Arg Gly Leu Val Ala Leu Met Val Ser Cys Pro  
 340

TGC GCG TTA GTG ATT TCT GTG CCT TTA GGG TAT TTT GGA GGC GTG  
 Cys Ala Leu Val Ile Ser Val Pro Leu Gly Tyr Phe Gly Gly Val  
 350 360

GGA GCG GCG AGC CGA AAG GGT ATT TTA ATG AAA GGC GTG CAT GTT  
 Gly Ala Ala Ser Arg Lys Gly Ile Leu Met Lys Gly Val His Val  
 370

TTA GAA GTG CTT ACC CAA GCT AAA AGC ATC GCC TTT GAT AAA ACC  
 Leu Glu Val Leu Thr Gln Ala Lys Ser Ile Ala Phe Asp Lys Thr  
 380 390

GGC ACT TTG ACT AAA GGC GTT TTT AAA GTA ACA GAT ATT GTG CCG  
Gly Thr Leu Thr Lys Gly Val Phe Lys Val Thr Asp Ile Val Pro  
 400

CAA AAC GGG CAT TCT AAA GAA GAA GTT TTG CAT TAC GCT TCT TGT  
 Gln Asn Gly His Ser Lys Glu Glu Val Leu His Tyr Ala Ser Cys  
 410 420

TCG CAG CTC TTA TCC ACG CAC CCT ATC GCT TTA TCC ATT CAA GAA  
 Ser Gln Leu Leu Ser Thr His Pro Ile Ala Leu Ser Ile Gln Glu  
 430

GCA TGC GAA GAA ATG TTA AAG GAC GAC AAG CAC CAG CAT GAC ATT  
 Ala Cys Glu Glu Met Leu Lys Asp Asp Lys His Gln His Asp Ile  
 440 450

AAA AAT TAC GAA GAA TTG AGC GGA ATG GGG GTT AAA GCG CAA TGC  
 Lys Asn Tyr Glu Glu Leu Ser Gly Met Gly Val Lys Ala Gln Cys  
 460

CAT ACG GAT TTA ATC ATC GCA GGG AAT GAA AAA ATG CTG GAT CAA  
 His Thr Asp Leu Ile Ile Ala Gly Asn Glu Lys Met Leu Asp Gln  
 470 480

TTC CAT ATC GCG CAC AGC CCT TCC AAA GAA AAC GGC ACG ATC GTG  
 Phe His Ile Ala His Ser Pro Ser Lys Glu Asn Gly Thr Ile Val  
 490

CAT GTG GCT TTC AAC CAA ACT TAT ATA GGC TAT ATC GTC ATT AGC  
 His Val Ala Phe Asn Gln Thr Tyr Ile Gly Tyr Ile Val Ile Ser  
 500 510

GAT GAG ATT AAA GAT GAC GCC ATA GAG TGC TTA AGG GAT TTA AAA  
 Asp Glu Ile Lys Asp Asp Ala Ile Glu Cys Leu Arg Asp Leu Lys  
 520

GCG CAA GGG ATA GAA AAT TTT TGC ATT TTG AGC GGG GAC AGA AAA  
 Ala Gln Gly Ile Glu Asn Phe Cys Ile Leu Ser Gly Asp Arg Lys  
 530 540

AGC GCG ACT GAG AGC ATC GCT CAA ACT CTG GGC TGT GAA TAT TAT  
 Ser Ala Thr Glu Ser Ile Ala Gln Thr Leu Gly Cys Glu Tyr Tyr  
 550

6 / 2 4

Fig. 2e

GCG AGT TTG TTG CCT GAA GAA AAA ACG AGC GTG TTT AAA ACT TTT  
 Ala Ser Leu Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ser Val Phe Lys Thr Phe  
 560 570

AAA GAA CGC TAT AAA GCC CCG GCG ATT TTT GTA GGC GAT GGT ATC  
 Lys Glu Arg Tyr Lys Ala Pro Ala Ile Phe Val Gly Asp Gly Ile  
 580

AAT GAC GCT CCG ACT CTA GCG AGC GCT GAT GTG GGG ATT GGC ATG  
 AsN Asp Ala Pro Thr Leu Ala Ser Ala Asp Val Gly Ile Gly Met  
 590 600

GGG AAA GGC TCA GAA TTG AGC AAG CAA AGC GCG GAC ATT GTG ATC  
 Gly Lys Gly Ser Glu Leu Ser Lys Gln Ser Ala Asp Ile Val Ile  
 610

ACC AAT GAC TCC TTA AAT TCG TTA GTG AAA GTT TTA GCG ATC GCT  
 Thr AsN Asp Ser Leu AsN Ser Leu Val Lys Val Leu Ala Ile Ala  
 620 630

AAA AAA ACT AAA AGC ATT ATT TGG CAA AAT ATC TTG TTC GCT TTG  
 Lys Lys Thr Lys Ser Ile Ile Trp Gln AsN Ile Leu Phe Ala Leu  
 640

GGG ATT AAA GCC GTT TTT ATC GTG CTA GGG CTT ATG GGG GTA GCG  
 Gly Ile Lys Ala Val Phe Ile Val Leu Gly Leu Met Gly Val Ala  
 650 660

AGC TTG TGG GAA GCG GTC TTT GGC GAT GTG GGG GTT ACG CTT TTA  
 Ser Leu Trp Glu Ala Val Phe Gly Asp Val Gly Val Thr Leu Leu  
 670

3278  
 GCC TTA GCC AAC TCC ATG CGC GCA ATG AGA GCT TAA  
 Ala Leu Ala AsN Ser Met Arg Ala Met Arg Ala \*\*\*  
 680 686

3300 3330  
 AG CCTTGAATCC ATCATCAAAG AGCTAGAAGG GGGGCAAAAT GAACCACATA

3380  
 GAAAACTAC TCCAAACCTT AGCGCCTAAA GGGGTGGAGT TTAGGAAGTT

3410  
 GGGGGAGGTG CTAGAATATG ATCTGAATTC

Fig. 3a

## TRANSLATION OF A NUCLEIC ACID SEQUENCE

DNA sequence PRH514.

Total number of bases is: 3097.

Analysis done on the complete sequence.

Done on (absolute) phase(s): 1 , 2 and 3.

Using the Universal genetic code.

## ORF Analysis

#	Start	End	Frame
ORF 1	115	1632	1

8 / 2 4

Fig. 3c

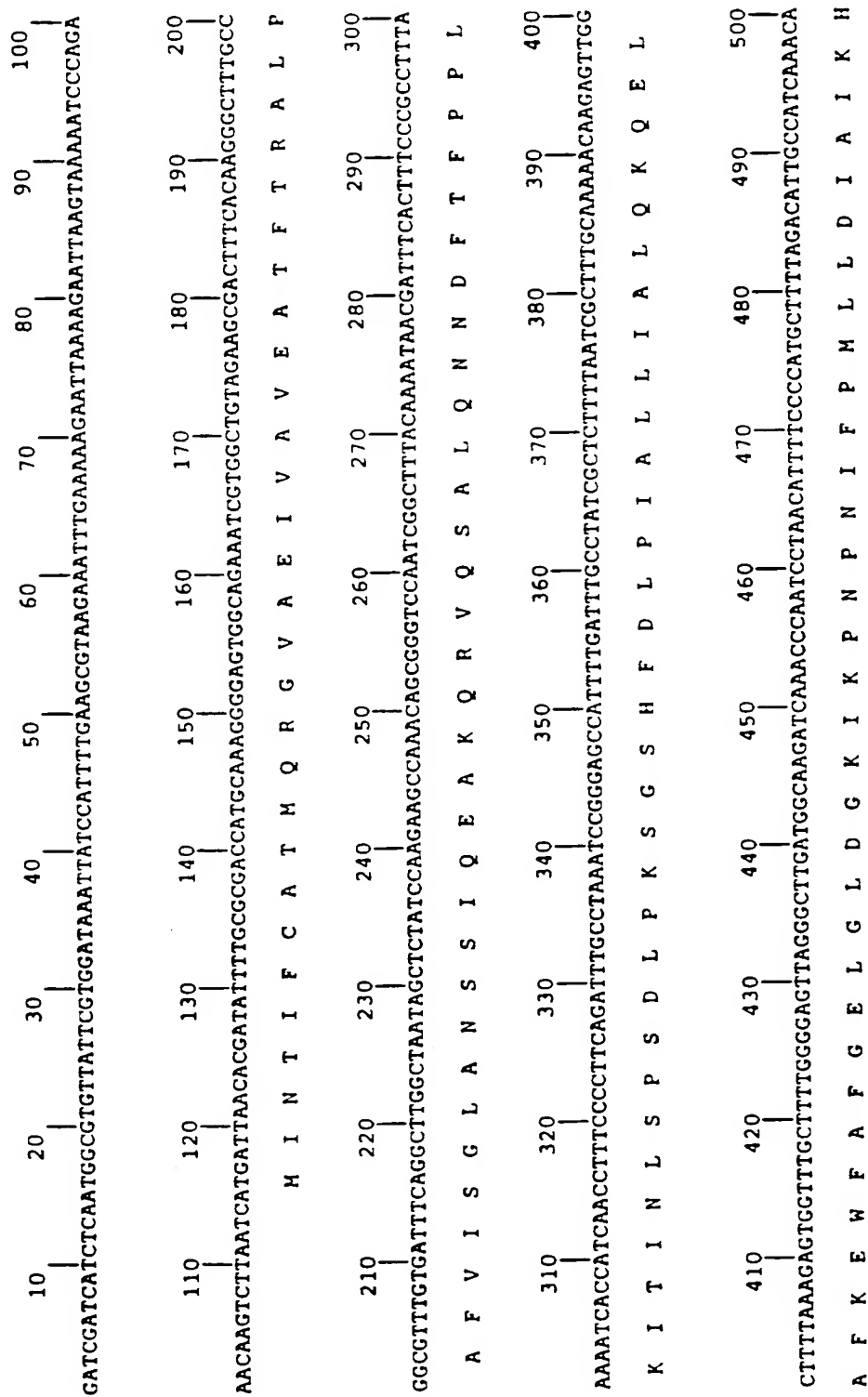


Fig. 3c

510 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |  
CCCCCATGCTAAAGTCATTTGGCCCTAAGGCTAATGAAGAGCTTTTTTTCGCTCATCCCTAATTGCAATGCTTTTTTGTGGAGCATTTTAAAGAAGCGTTA  
P H A K V I A P K A N E E L F S L I P N L Q C F F V E H F K E A L

610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 | 670 | 680 | 690 | 700 |  
GAAATCTTACAAAACCCCTGAATCAAGCAGACACCCACACGAAAAAATACTACCCCTTTAAACGATAGAAATTGAACGATAAAGAGTATTATTTTCAGAGCG  
E I L Q N P E I K A D T H T K K L P F K T I E L N D K E Y Y F S D

710 | 720 | 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 | 790 | 800 |  
CCTATGCTATAGATTTTAAAGAGTTAAGGGGCAAGCTGTCGCTAAGAGAGCCGCTTTGATCGCTAGCGCTGGGTTTCATTAACCTTGATTTTAGAGGGAAG  
A Y A L D F K E V K G Q A V A K E A A L I A S A G F H N L I L E G S

810 | 820 | 830 | 840 | 850 | 860 | 870 | 880 | 890 | 900 |  
TCCAGGGTGCGGAAAGCATGATCATTAAATCGCATGCGTTATATTTTACCTCCCTTAAGCCCTGAATGAAATCCTAGAGCGGACAAAATTAACGATTTTA  
P G C G K S M I I N R M R Y I L P P L S L N E I L E A T K L R I L

910 | 920 | 930 | 940 | 950 | 960 | 970 | 980 | 990 | 1000 |  
ACCGAACAGACAGCGCCCTATTACCCCTTAAGGAGTTTTAGAAACCCCTCACCAAGCGCTTCAAAATCCAGCATTTTAGGCTCAAGCTCTCTAAAAGAGC  
S E Q D S A Y Y P L R S F R N P H Q S A S K S S I L G S S L K E

1010 | 1020 | 1030 | 1040 | 1050 | 1060 | 1070 | 1080 | 1090 | 1100 |  
CAAAACCGCGGAATGCGCGTAGCGGATAACGGCGATGCTTTTTTTGATGAATGCGCTCATTTTAAAGAGGAAATTTTGAAGCTTTAAGAGAGCGCTTT  
P K P G E I A V A H N G M L F F D E L P H F K K E I L E A L R E P L



Fig. 3d

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200  
AGAAAACAATAATTGGTGGTTTCACGAGTGCATAGCAAAATTGAATACGAACCTCTTTTATTTGTTGGGGGCTCAAAACCCCTTGCTTGTGTGGGAAT  
E N N K L V V S R V H S K I E Y E T S F L F V G A Q N P C L C G N  
1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300  
TTACTCAGTGCACCAAGCATGCCGTTGCCAAGACAGAGAAATCACCAGTATAAAACCGCTTGAGCGAGCCCTTTTATAGATAGGATTGATTGTTGTTG  
L L S A T K A C R C Q D R E I T Q Y K N R L S E P F L D R I D L F  
1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400  
TGCAAAATGGAAGAGCGGAATTATAAAGACACGCCGTCGCTTCTGGACTTCAAAAGAGATGCATCAATTAGTATTATTAGCTTTCAAACAGCAAAAT  
V Q M E E G N Y K D T P S H S W T S K E M H Q L V L L A F K Q K L  
1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500  
AAGGAAACAGAGCGTTTTTAATGGTAAGCTTAATGAAGAGCAGATAGAACGATTTTGGCCCTTTAAACGCTGAAGCAAAAAGTTGTTAGAGCAGCGCGTT  
R K Q S V F N G K L N E E Q I E R F C P L N A E A K K L L E Q A V  
1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600  
GAAGGTTTAATCTGTCCATGCGCTCTGTTAATAAGGTCAAAAAGTCCGACGAGATTCGGGATTTAAACGCTTGGAGANTATAGAAAATCTCACA  
E R F N L S M R S V N K V K V A R T I A D L N A C E N I E K S H  
1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700  
TGCTTAAAGCGCTGAGTTTTAGAAAGATTTCTTAAAGGATTTTATAAGGGAGAGAAAATGCAAGAATACCAATTCATATAATTTGGATTGCCCTGATTG  
H L K A L S F R K I S -

11/24

Fig. 3e

1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800  
CGCGTCTAAATTGGAAGGGATTAAACAACTAGACTATGTGAAAAAGCTCAATCAATTTTCAGCACCCAGCAGGTTGTTTTTGGACACGAGCGATTTT

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900  
GAAAAAGTTAAGGCTTTTATCAAGCAGATGAACCGCATTTGAGCCGTGCTTTTTAAGAGGCGCGAGAAAAAGCCCTTGAGTTTACGCCACTCATTTGTTA

1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000  
CGATCGCTGCTTTTTAGCGCGGATTTTAAATCTTACACCTAAACCCTAGCCCTTTGATTGAAAGGCTAATGTTTTTCGTGTTGGCTTTGGTGATCTAGT

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100  
GAGCGGTAAAGATGTGATTTTAGGGGCGTTTCGTGGGCTTAGGAAGGGCAGTTTTTTTGATGAAAAAGCTTTTCATGCTCATTTGCCGACTATTGCGGCTTTT

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200  
TGCGTGGGGGCTTATGAAGAGAGCGGTGCTATTATGGTGTTTTATTACAGCGGGCGAATTTTTCAGAAAACTCGCTATCGCTCGCTCTAAAAAATCCCTTA

2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300  
AGGCTTTAGTGGATGTCGCTCCTAATTTGGCTTATTTGAAAAAGGGCGATGCGTTAGTGAGCGTTGCGCCTGAAGATTAAAGAATTAATGACATTGTGGT

2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400  
GGTGAAAGTCGGCGAAAAAGTGCTGTGGATGCGCTGGTGGATTAAAGGCGAAAAAGTTTGCTAGATGAAGGGCGTTGCGGGGGAGTCTATGCCGGTTAAT

12/24

Fig. 3f

2410 | 2420 | 2430 | 2440 | 2450 | 2460 | 2470 | 2480 | 2490 | 2500 |  
GTCAGCGAAGCCTCTAAGTTTTAGGGGGAGCTTGAATTTAAAGCGTCCTTGAAATTCAGTAGAGAAATGTATAAGATTCTTCTATCGCTAAG

2510 | 2520 | 2530 | 2540 | 2550 | 2560 | 2570 | 2580 | 2590 | 2600 |  
TGGTAGATTGGTCCACAGCCACGAATGNAAGAGCGAACCAGAAATTTATCACTAAATTTTCACGCTACTACACCCCAAGCGTTTATTTCATTGC

2610 | 2620 | 2630 | 2640 | 2650 | 2660 | 2670 | 2680 | 2690 | 2700 |  
GTTAATGATTGCTGATTACCGCCCTTATTTCTATGGGAGCTTTGATGAGTGGATTTATAGGGGCTTGTTGGCTTTAATGGTGAGCTGCCCTTGGCGG

2710 | 2720 | 2730 | 2740 | 2750 | 2760 | 2770 | 2780 | 2790 | 2800 |  
TTAGTGATTTCTGTGCCTTTAGGGTATTTTGGAGCGGTGGGAGCGCGAGCCGAAAGGGTATTTTAATGAAGCGGTGCATGTTTTAGAACTGCTTACCC

2810 | 2820 | 2830 | 2840 | 2850 | 2860 | 2870 | 2880 | 2890 | 2900 |  
AAGCTAAAGCATCGCCTTTGATAAACCAGGCACTTTGACTAAAGCGTTTTTAAGTAACAGATATTGTCCGCGAAGCGGGCATTTCTAAGAAAGT

2910 | 2920 | 2930 | 2940 | 2950 | 2960 | 2970 | 2980 | 2990 | 3000 |  
TTTGCAATACGCTTCTTGTTGCGAGCTTATCCACGACCCCTATCGCTTTATCCATTCAGAGCATGCCAAGAAATGTTAAAGGACGACAAAGCACCAG

3010 | 3020 | 3030 | 3040 | 3050 | 3060 | 3070 | 3080 | 3090 |  
CATGACATTAAATACGAAGATTGAGCGGAATGGGGTTAAAGCGCAATGCCATACGGATTTAATCATCGCAGGGAATGAAAAAATGCTGGATC

Fig. 4a

## TRANSLATION OF A NUCLEIC ACID SEQUENCE

DNA sequence PRH948C.

Total number of bases is: 4495.

Analysis done on the complete sequence.

Done by PC/GENE V.6.8 on (absolute) phase(s): 1 , 2 and 3.

Using the Universal genetic code.

Underlined: Vector sequences

## ORF Analysis

#	Start	End	Frame
ORF 1	10	936	1
ORF 2	1162	1872	1
ORF 3	1710	1853	3
ORF 4	1871	4094	3
ORF 5	4098	4295	3
ORF 6	4400	4481	3 (incomplete at end)

14 / 24

Fig. 4b

10 20 30 40 50 60 70 80 90 100  
TTGAATTCAGATCCGGCCTTAATGCGTCCAGGGCGCTTTGACAGGCAGGTTTGTAGTGATAAGCCTGATTTTAAATGGCAGAGTAGAAATCTTAAAAAGTGC  
D P A L M R P G R F D R Q V L V D K P D F N G R V E I L K V

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200  
ATATTAAAGGCGTGAACTCGCTAACGATGTGAATTTGCAAGAGTCCGCCAACTCACCGCAGGGCTTGCAGAGCGGATTTAGCGAATATCATCAATGA  
H I K G V K L A N D V N L Q E V A K L T A G L A G A D L A N I I N E

210 220 230 240 250 260 270 280 290 300  
AGCCGCGCTTTTAGCAGGAGAAACRACCAAAAGAGTCAAGGCCAACAGCCTTTTAAAGAGAGCGGTTGAAGAGAGGATTCGGGGTTAGAAAGAAAGAAAGC  
A A L L A G R N N Q K E V R Q Q H L K E A V E R G I A G L E K K S

15 / 24

Fig. 4c

310 | 320 | 330 | 340 | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |  
AGGCGCATCAGTCCTAAGGAAAAGAAAATCGTCGCCCTACCATGAAGCGGCGATGCCGTGATTTCTGAAATGACTAAAGGAGTGCTAGGGTGAATAAAG  
R R I S P K E K K I V A Y H E S G H A V I S E M T K G S A R V N K

410 | 420 | 430 | 440 | 450 | 460 | 470 | 480 | 490 | 500 |  
TTTCTATCATTCCAAGGGCGCATGGCGGCTTAGGCTACACCCCTTAACACGCCCTGAAGAAAACAATACTTGATGCAAAAACACGAACTCATCGCTGAAT  
V S I I P R G M A A L G Y T L N T P E E N K Y L M Q K H E L I A E I

510 | 520 | 530 | 540 | 550 | 560 | 570 | 580 | 590 | 600 |  
TGATGTCTTTTAGCGGAAGAGCGGCTGAAGATGCTTTTGGAGAAATTTCTACCGGTGGAGCAACGATTAGAAAAGAGCGGACTGATATTATTAA  
D V L L G G R A A E D V F L E E I S T G A S N D L E R A T D I I K

610 | 620 | 630 | 640 | 650 | 660 | 670 | 680 | 690 | 700 |  
GGCATGGTGAGTTACTACGCGCATGAGCAGTGTCACTAGTGGCTTATGGTGTAGAAAAGCAACCGAACGCCCTTTTGGAGGCGGTTAIGGAAGCAGTAGGG  
G M V S Y Y G M S S V S G L M V L E K Q R N A F L G G G Y G S S R

710 | 720 | 730 | 740 | 750 | 760 | 770 | 780 | 790 | 800 |  
AATTTAGCGAAAACCGCAGAGAAATGGATCTTTTCATTAAAACTTGCTAGAGAGCGGCTATGAGCATGTCAAAACAACCCCTTGAGCGACTACAGAGA  
E F S E K T A E E M D L F I K N L L E E R Y E H V K Q T L S D Y R E

810 | 820 | 830 | 840 | 850 | 860 | 870 | 880 | 890 | 900 |  
AGCGATTGAATCATGGTCAAGNATGTTTGACAAAGAAGTCAATACAGCGCAAGGGTGGCTGAATCATCAGCGGAATACGAAGTTGCCAACAATTTA  
A I E I M V K E L F D K E V I T G E R V R E I I S E Y E V A N N L

16 / 24

F. 1. 42

910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000  
G A A G C C G T T T G A T T C C T T T A G A A G A G C A G C G A G T T A A G A G T G C G A G C T T A C A A C A G A T T T T T G A T A A G G G T T T A A G C C T T A T T A T A A C A C A T T C T G T

E S R L I P L E E Q A S -

1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100  
T T G T T T A A A G C T T T T T T T T A G A T T T T G T T T T C T C A A A A C T C A T G C T T A C C A A C A G C G T T A T A A A G C G T T C G C T C T A A C C T C T T T T C T T G T G A G T T T T T

1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200  
A A C G C T T G T A A G A T T T T T A T T C C T A T T C T A A A T A C C A A G C C A A G T T A A A A A G A A T C T C T A A T G C C T A T T A A C C C T C T C T A T C T T T T C C C T A A T C T T T T

M P I N P L Y L F P N L F

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300  
A C C G C T A G C A G A T T T T T T T A G G C A T G A T G A T A T T T T T A C G C T T C C A G T T A C C A A T T T T G C A T G C G C G T G T T G G T T A G T G G T A G C G A G C C T A T T T T A G

T A S S I F L G M H S I F Y A S S Y Q F V M A C W L V V A S L I L

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400  
A C G G C T T G A T G G G C G T G T C G C A A G C C T T A C C A C A C C A G C A G T T T G C T A T A G A A T T T G A C T C A C T G G C T G A T G T A T C G C T T T T G G G G T A G C C C C

D G L D G R V A R L T N T T S K F G I E F D S L A D V I A F G V A P

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500  
A A G C T T A A T C A C T T A C T T T T A T G T G G G T A T A A C T T T G G G C G C A T A G G C A T G C G G T G A G C G G T T G T T G T G A T T T T T G G A C G C A T A C G A T T G G C A C C A

S L I T Y F Y V G Y N F G R I G M A V S A L F V I F G A I R L A R

17 / 24

Fig. 4e

BNSDOCID <WO 9617066A1 | >



18 / 24

Fig. 4f

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200  
TTTTAGCCCTAAATGTTAAATTAGCGTTGGCGGTTATTTTACAGCCTTTTGTGCTGTATCTTCTATGGGGCGGATGCTTAGTCCTAGCCTTTTACCTGA  
F F S P N V K L A L A V I F T L F V V Y L S M G A M L S P S L L P E  
2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300  
AAGCTTGCTTACGATTAAACAACCATAGTAATTTTAAACGCATGCTTACAGCTTATAGGCACGCTCATTTGTCATGCTATTAGGGAGGGATTTTACATT  
S L L T I N N H S N F L N A C L Q L I G T L I V M H L G R D F Y I  
2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400  
CAAGGGTTTAAAGCCTTATGGCACACACAACCCACATGATGAGCCTTATCGCCATAGGCACACAGCGCTGCTTAATCTCAAGCTTGTGGCAATTGTATT  
Q G F K A L W H R Q P N M S S L I A I G T S A A L I S S L W Q L Y  
2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500  
TCGTTTATACAAGCCAGTGGTCTTATGGGCATTATTATTTGAAAGCGTGTGCGTGATTTTAAATGTTTGTAAATGGTGGCMAACGCATTGAAAATGTTTC  
F V Y T S Q W S Y G H Y Y F E S V C V I L M F V M V G K R I E N V S  
2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600  
TAAAGACAAAGCTTAGACGCTATGCNAGCCTTGATGAAAACGCCCCCAAAAACGCCCTTAAATATGCACAAATAACCAACAGATTGAAGTTTATAGTGAT  
K D K A L D A H Q A L M K N A P K T A L K M H N N Q Q I E V L V D  
2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700  
AGCATTGGTGGGGGATATTCTAAAGGTTCTCCCTGGAAAGCGCGATTGCGGTGATGGCGGAATCATAGAGGGCGAAGGGGAATTAGATGAAGCATGT  
S I V V G D I L K V L P G S A I A V D G E I I E G E G E L D E S H

19 / 24

Fig. 4g

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800  
TAAGCGGCGAAGCGTTGCCGGTTTATAAAAAGTCGGCGATAAAGTCTTTTCAGGGACATTCAATAGCCACACGAGTTTTTTTAATGAAGCCACGCAAGA  
L S G E A L P V Y K K V G D K V F S G T F N S H T S F L M K A T Q D

2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900  
TAACAAAAACAGCACCTTGTCTCAAAATTGTAGAAATGATCCATAACGCTCAAAAGCTCAAAGGCAGAGATTTCTCGCTTAGCCGATAGGTTTCAAGCGTG  
N K N S T L S Q I V E M I H N A Q S S K A E I S R L A D K V S S V

2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000  
TTTGTGCCAAGCGTGATCGCTATCGCTATTTTAGCGTTTGTGGTGGCTCATCATCGCGCCCTAAACCCGATTTTGGTGGAAATTTGGCAATCGCTTTAG  
F V P S V I A I A I L A F V V W L I I A P K P D F W N F G I A L

3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100  
AAGTCTTTGTATCGGTTTGTAGTGATTCTTGGCCCTTGGCTTTAGGATTGGCTACACCTATGAGTATTTTAGTAGCGAACCACAAAGCGAGTCTTTTAGG  
E V F V S V L V I S C P C A L G L A T P M S I L V A N Q K A S S L G

3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200  
TTTATTTTAAAGACGCTAAAAGTTTAGAAAAGCAAGGCTAGTCAATACGATCGTTTTTGTATAAACCGGCACGCTCACTAACGGCAAGCCTGTCGTT  
L F F K D A K S L E K A R L V N T I V F D K T G T L T N G K P V V

3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300  
AAAAGCGTTTCATTCTAACATAGAATTATTAGATTATTAGTTTACCGCGCAGTATTGAAAAGACGACGCAACATGTCATTTGCTAAAGGGATTGTAGAAAT  
K S V H S N I E L L E L L S L A G S I E K S S E H V I A K G I V E

20/24

Fig. 4b

3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400  
ACGCCAAGAGCATAACGCTCCCTTAAAGAAATGAGTGAAGTAAAGTGAAAACGGGTTTGGCATCAGCGCTAAACACAGATTATCAAGGCGCTAAAGA  
Y A K E H N A P L K E M S E V K V K T G F G I S A K T D Y Q G A K E  
3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500  
GGTTATCAAAGTCGGTAATAGCGAATTTTAAACCCTATTAAACGCACTAGAAATCAAGAAACGGGATTTTAGTGTTTGGGTAGAGTGATCACTGAA  
V I K V G N S E F F N P I N A L E I Q E N G I L V F V G R V I S E  
3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600  
AAAGAAGACGAGCTTTTAGGGCGGTTTCTTTAGAAGATTTGCCCAAAAAGCGCTGAAGAGCATATCGCTCAAAATCAAAAAATTAGGCATTAAACACTT  
K E D E L L G A F V L E D L P K K G V K E H I A Q I K K L G I N T  
3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700  
TTCCTTTAAGCGGGACATAGAGAGATGTCAAAAAATGCGCGCTTGAATTAGGATTTGATGGTTATATCAGCAACGCTAAACCAAGACAAGCTCAA  
F L L S G D N R E N V K K C A L E L G I D G Y I S N A K P Q D K L N  
3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800  
CAAGATCAAAGAGCTTAAGGAAAAGGGCAGATCGTTATGATGGTAGGCGATGGCTTGAATGACGCTCCTAGCCTTGCTATGAGCGATGTGGCAGTGGTG  
K I K E L K E K G Q I V H M V G D G L N D A P S L A M S D V A V V  
3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900  
ATGGCTAAAGGGAGCGGTGTGAGCGTGCACAGCGGATATTGTGAGCTTTAATAACACACATTAAATCGGTTTATAGCGGATTAAATTGAGCCAAGCGA  
H A K G S D V S V Q A A D I V S F N N D I K S V Y S A I K L S Q A

21/24

Fig. 41

3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000  
CCATCAAAATATCAAGAAATTTGGGCTTTTGGTTATAATAGCGTGTATCCCTTTAGCTTGTGGGTTCTTTATAAAGCTAATATCATGTT  
T I K N I K E N L F W A F C Y N S V F I P L A C G V L Y K A N I M L  
4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100  
AAGCCCGCGGATTGCGGTTTAGCGATGAGTTTAAGCTCTGTGAGTGTGGTCTTAAACTCCCAAGCGCTAAGGAATTTTAAATTAAGGATCATTTGAATG  
S P A I A G L A M S L S S V S V V L N S Q R L R N F K I K D H - M  
4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200  
AAAGTTACTTTTCRAAGTCCCAAGCATTTACTTGCAACCATTTGCGTGGATAAATTTGCGCGGAATTTGAAGGTGTGAGCTTTTATTGATGCGA  
K V T F Q V P S I T C N H C V D K I E K F V G E I E G V S F I D A  
4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300  
GCGTGGAAAAAAGCGGTGGTTGTAGNATTTGACGCTCCAGCGACACAGGATTTGATTAGGAAGCCCTTATTGGATCGGGGCGAAGTAATATAATA  
S V E K K S V V V E F D A P A T Q D L I K E A L L D A G Q E V I - -  
4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400  
AAGGTGTGATATAGACATCGGATTAAAAACCGCAATTCAAAAGGGTGTGTTATCTTTTAATCTTGGGTTTGTGGGTATTTTCAGGCCCTTCA  
4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490  
ATGGTGATTTATCATACCATTAAGAGAAAAATATCGTATTTCCCGCTTTCTTACCCCAATTTTATACATACGGATCTCGAGGTACCCGGG  
M V I Y H N H K R K N Y R I S P F S Y S N F L Y I R I

22 / 24

Fig. 5

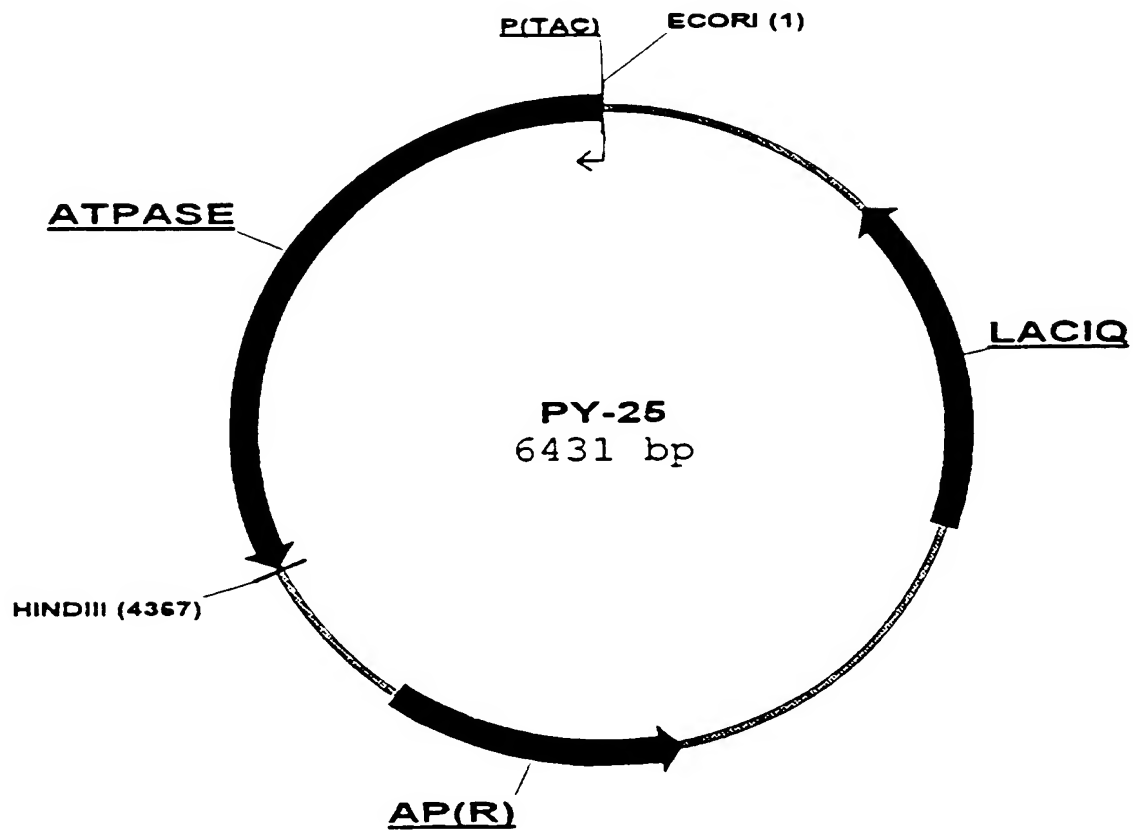
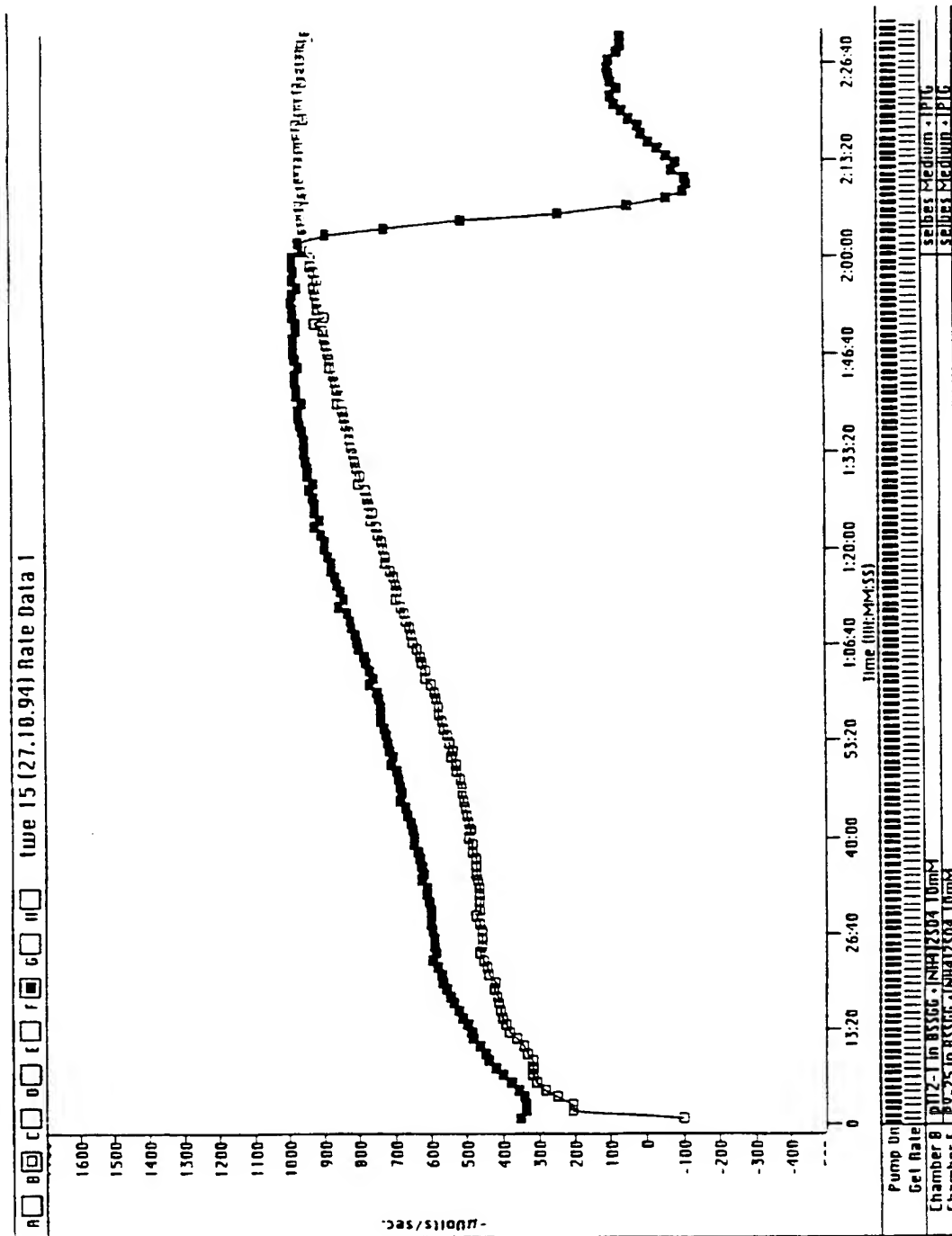
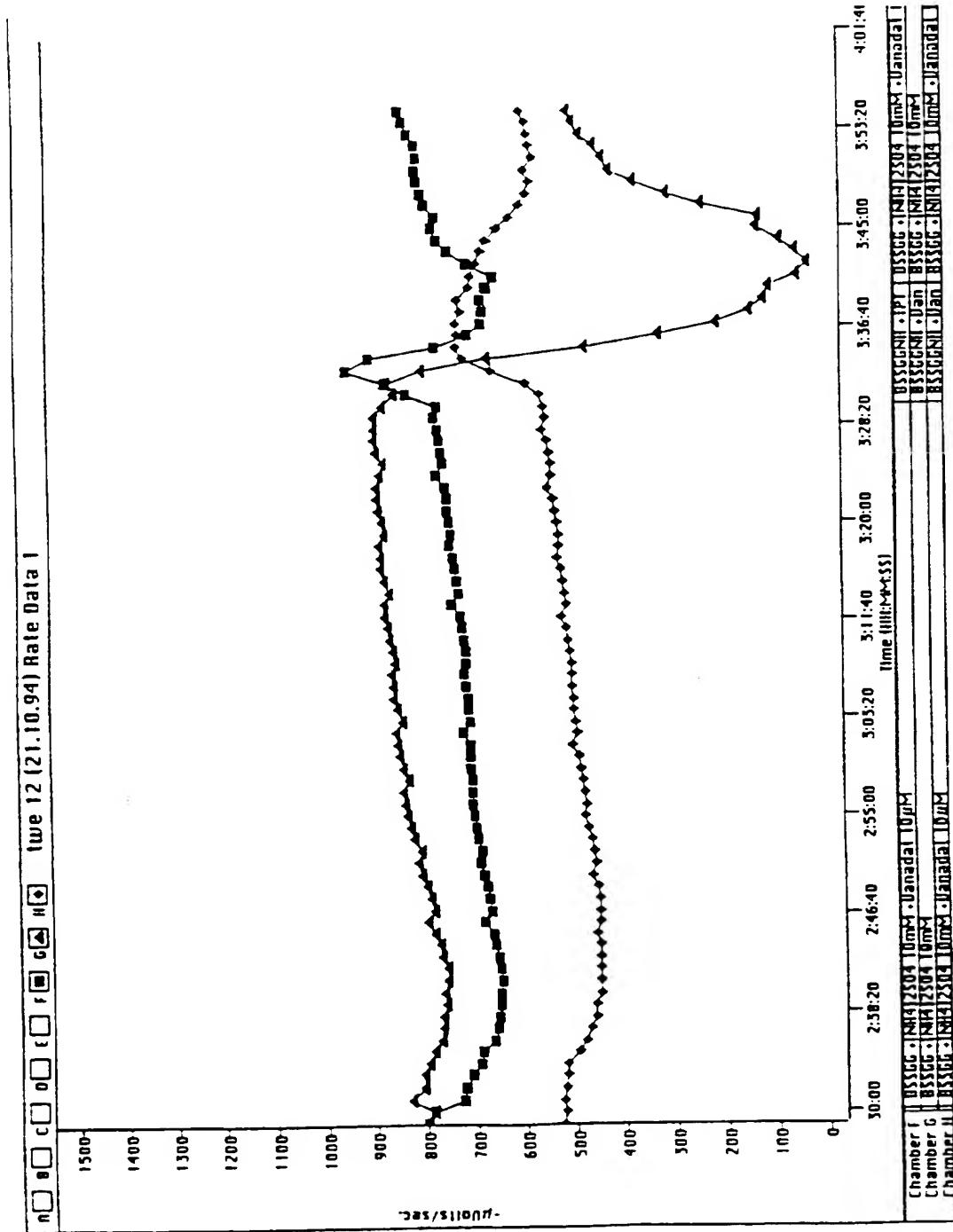


Fig. 6



24 / 24

Fig. 7



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
EP 95/04711

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N15/55 C12Q1/42  
//(C12N1/21,C12R1:19)

C12N1/21 C12N15/70 C12Q1/18

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	AM. J. GASTROENTEROLOGY, vol. 89, no. 8, August 1994 page 1288 HARMAN ET AL. 'Characterization of a P-type ATPase of Helicobacter pylori' see abstract nr 11 ---	1-5,10, 13,16
Y	WO,A,94 23059 (THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF DUNDEE) 13 October 1994 see page 8 - page 9 see page 11, line 24 - line 31 see page 12, line 19 - line 21 see page 13, line 16 - line 35 see page 17, line 29 - line 34 see page 19, line 23 - line 35 see pages 20,22-26 --- -/--	1-5,10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \* "E" earlier document but published on or after the international filing date
- \* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\* "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 March 1996

Date of mailing of the international search report

02.04.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (- 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (- 31-70) 340-3016

Authorized officer

Gac, G



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/EP 95/04711

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	MOL. MICROBIOL., vol. 15, no. 1, January 1995 pages 97-106, GE ET AL. 'Nucleotide sequence and mutational analysis indicate that two Helicobacter pylori genes encode a P-type ATPase and a cation-binding protein associated with copper transport' see the whole document ---	1,2,10, 13,16
P,A	GUT, vol. 37, no. suppl, 7 - 9 July 1995 page a21 MELCHERS ET AL. 'Complexity of P-type ATPase genes in the genome of Helicobacter pylori' see abstract nr 81 ---	11-16
A	AM. J. GASTROENTEROLOGY, vol. 88, no. 10, October 1993 pages 1801-1802, MAUCH ET AL. 'Identification and characterization of an ATPase system of Helicobacter pylori and the effect of proton pump inhibitors' see the whole document ---	1,10
A	BIOPHYS. J., vol. 64, no. 3, 1993 pages 813-823, MILLER ET AL. 'Cholinergic stimulation of the Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> adenosine triphosphatase as revealed by microphysiometry' see the whole document -----	9

P 95/04711

Form PCT-TSA-210 (patent family annex) (July 1992)

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen  
PC 1/EP 95/04711

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/55 C12Q1/42 C12N1/21 C12N15/70 C12Q1/18  
//(C12N1/21,C12R1:19)

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	AM. J. GASTROENTEROLOGY, Bd. 89, Nr. 8, August 1994 Seite 1288 HARMAN ET AL. 'Characterization of a P-type ATPase of Helicobacter pylori' siehe Zusammenfassung Nr 11 ---	1-5,10, 13,16
Y	WO,A,94 23059 (THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF DUNDEE) 13.Oktober 1994 siehe Seite 8 - Seite 9 siehe Seite 11, Zeile 24 - Zeile 31 siehe Seite 12, Zeile 19 - Zeile 21 siehe Seite 13, Zeile 16 - Zeile 35 siehe Seite 17, Zeile 29 - Zeile 34 siehe Seite 19, Zeile 23 - Zeile 35 siehe Seiten 20, 22-26 --- -/-	1-5,10

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

## \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

22.März 1996

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

02.04.96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Gac, G

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PC1/EP 95/04711

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,Y	MOL. MICROBIOL., Bd. 15, Nr. 1, Januar 1995 Seiten 97-106, GE ET AL. 'Nucleotide sequence and mutational analysis indicate that two Helicobacter pylori genes encode a P-type ATPase and a cation-binding protein associated with copper transport' siehe das ganze Dokument ---	1,2,10, 13,16
P,A	GUT, Bd. 37, Nr. suppl. 7. - 9.Juli 1995 Seite a21 MELCHERS ET AL. 'Complexity of P-type ATPase genes in the genome of Helicobacter pylori' siehe Zusammenfassung Nr 81 ---	11-16
A	AM. J. GASTROENTEROLOGY, Bd. 88, Nr. 10, Oktober 1993 Seiten 1801-1802, MAUCH ET AL. 'Identification and characterization of an ATPase system of Helicobacter pylori and the effect of proton pump inhibitors' siehe das ganze Dokument ---	1,10
A	BIOPHYS. J., Bd. 64, Nr. 3, 1993 Seiten 813-823, MILLER ET AL. 'Cholinergic stimulation of the Na+/K+ adenosine triphosphatase as revealed by microphysiometry' siehe das ganze Dokument -----	9

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/JP95/04711

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9423059	13-10-94	AU-B- 6380094	24-10-94
		EP-A- 0690924	10-01-96
-----			

Formblatt PCT ISA 218 (Anhang Patentfamilie) Juli 1992)

